

Документ подписан простой электронной подписью
Информация о владельце:
ФИО: Солоненко Анна Александровна
Должность: Директор
Дата подписания: 02.05.2024 14:22:51
Уникальный программный ключ:
d9ba9a2cd160ac4e0421b478a095718f050e91



Федеральное агентство по рыболовству
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования

«Астраханский государственный технический университет»

Система менеджмента качества в области образования, воспитания, науки и инноваций сертифицирована DQS по международному стандарту ISO 9001:2015

Факультет высшего образования

Кафедра «Аквакультура и экология»

ИХТИПАТОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ И КОНТРОЛЬ

Методические указания

по выполнению лабораторных работ
для обучающихся по направлению подготовки,
35.04.07 Водные биоресурсы и аквакультура
Направленность «Управление водными биоресурсами»

п. Рыбное, Дмитровский г.о., Московская обл. – 2022

Составитель:

Головина Н.А. д.б.н., зав. кафедры «Аквакультура и экология»

Методические рекомендации по выполнению лабораторных работ по дисциплине предназначены для обучающихся по направлению 35.04.07 Водные биоресурсы и аквакультура, направленность «Управление водными биоресурсами». Цель методических указаний: оказание помощи обучающимся в выполнении лабораторных работ по дисциплине. Настоящие методические указания содержат работы, которые помогают обучающимся овладеть фундаментальными знаниями, профессиональными умениями и навыками деятельности.

Методические рекомендации по выполнению лабораторных работ по дисциплине утверждены на заседании кафедры «Аквакультура и экология» «25» мая 2022 г., протокол №7.

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Методические указания по выполнению лабораторных работ по дисциплине «Ихтиопатологический мониторинг и контроль» предназначены для обучающихся по направлению 35.04.07 Водные биоресурсы и аквакультура Направленность «Управление водными биоресурсами».

Цель методических указаний: оказание помощи обучающимся в выполнении лабораторных занятий по дисциплине «Ихтиопатологический мониторинг и контроль».

Цель лабораторных занятий – освоение компетенций, направленных на углубление умений и освоение навыков трудовой деятельности.

Готовясь к занятию, магистранты должны:

1. Познакомиться с рекомендуемой преподавателем литературой.
2. Рассмотреть различные точки зрения по изучаемой теме, используя все доступные источники информации.
3. Выделить проблемные области и неоднозначные подходы к решению поставленных вопросов.
4. Сформулировать собственную точку зрения.
5. Предусмотреть возникновение спорных хозяйственных ситуаций при решении отдельных вопросов и быть готовыми сформулировать свой дискуссионный вопрос.

Планируемые результаты обучения по дисциплине

Код	Определение	Планируемые результаты обучения по дисциплине (модулю), соотнесенные с планируемыми результатами освоения образовательной программы		
		Знать	Уметь	Владеть навыками и (или) иметь опыт
ПК-4	Способен организовать проведение ихтиопатологического мониторинга в соответствии со стратегией развития технологических процессов управления водными биоресурсами и объектами аквакультуры	основные методы организации проведения ихтиопатологического мониторинга в соответствии со стратегией развития технологических процессов управления водными биоресурсами и объектами аквакультуры	организовать проведение ихтиопатологического мониторинга в соответствии со стратегией развития технологических процессов управления водными биоресурсами и объектами аквакультуры	способностью организовать проведение ихтиопатологического мониторинга в соответствии со стратегией развития технологических процессов управления водными биоресурсами и объектами аквакультуры

Структура лабораторных занятий

Лабораторные занятия по дисциплине регламентированы учебным планом по направлению 35.04.07 Водные биоресурсы и аквакультура Направленность "Управление водными биоресурсами"

№	Наименование разделов и тем /вид занятия/	Семестр / Курс	Часов	Компетенции	Примечание
1	Проведение клинического и патологоанатомического обследования рыб	2	4	ПК-4	
2	Диагностическое значение гематологических показателей и их определение	2	4	ПК-4	
3	Контроль за состоянием здоровья рыб	2	4	ПК-4	
4	Эпизоотологическое обследование рыбоводных предприятий и рыбохозяйственных водоемов	2	4	ПК-4	
5	Профилактика болезней рыб на рыбоводных предприятиях	2	4	ПК-4	
6	Организация борьбы с болезнями рыб в рыбоводных хозяйствах различного типа	2	4	ПК-4	
7	Взятие и транспортировка патологического материала при диагностике инфекционных болезней рыб.	2	4	ПК-4	
8	Жгутиконосцы, паразитирующие у рыб	2	4	ПК-4	
9	Инфузории, паразитирующие у рыб	2	4	ПК-4	
10	Кокцидии, паразитирующие у рыб	2	4	ПК-4	

Лабораторная работа №1. Проведение клинического и патологоанатомического обследования рыб

Цель работы:

1. Ознакомление с порядком проведения клинического осмотра рыб.
2. Освоение метода патологоанатомического вскрытия.

Материалы и оборудование: аквариум, живая рыба, сачок, ведро, столик для фиксации рыбы, ножницы, скальпель, пинцет, препаровальные иглы, чашки Петри, глазная пипетка, дистиллированная вода, рабочая тетрадь.

Задание:

1. Провести клинический осмотр группы рыб, взятой для обследования.
2. Проведение патологоанатомического вскрытия.

Теоретическая часть

Данные по клиническому осмотру и патологоанатомическому вскрытию рыбы необходимы: при составлении акта эпизоотологического обследования. Клинический осмотр начинают с наблюдения за поведением рыб в водоеме. В зависимости от проявления заболевания и его особенностей рыбы могут плавать у поверхности воды или уходить в глубину, собираться на притоке или держаться у берегов, совершать несвойственные им движения. Так, например, при миксосомозе форели рыба плавает по кругу. После длительного движения она ложится на дно, а затем снова начинает совершать круговые движения. При хилоденеллозе рыбы выскакивают из воды и плашмя падают обратно в воду. При бронхиомикозе, ихтио-фтириозе, дактилогирозе и других заболеваниях рыба перестает брать корм, собирается у притока. При лигулидозах становится малоактивной, лежит на боку. Таким образом, изменение поведения рыбы является важным симптомом, указывающим на необходимость проведения диагностических исследований.

Клинический осмотр рыбы проводят выборочно непосредственно при ее вылове из водоема. При этом рекомендуют просматривать не менее 100 рыб каждого вида и возраста, имеющих в водоеме. В рыбоводных хозяйствах его проводят при контрольных обловах прудов или отлавливая из бассейнов или садков. Определяют вид рыбы, ее среднюю массу, размер, возраст. Осмотр ведут в хорошо освещенном месте, вынимая из воды рыбу по одной. Осматривают кожные покровы и плавники, обращая внимание на количество слизи, пигментацию, наличие опухолей, цист, некротических участков, язв, рубцов, состояние чешуйчатого покрова.

Приподнимая жаберные крышки, осматривают жабры. Обращают внимание на форму и структуру жаберных лепестков, их окраску и степень ослизнения. Осматривают ротовую полость на наличие язв, новообразований, слизи, изменение окраски. При осмотре глаз обращают внимание на их форму, наличие кровоизлияний, цвет хрусталика и роговицы.

Рыб с выраженными клиническими признаками заболевания отсаживают в ведро, подсчитывают процент пораженных рыб. Отсаженную рыбу переносят в лабораторию, где проводят патологоанатомическое вскрытие и другие специальные лабораторные анализы для окончательной постановки диагноза.

Для контроля за особенностями поведения рыбу переносят в аквариум и наблюдают за ее поведением, координацией движений, частотой дыхательных движений, реакцией на внешние раздражители (шум, удары, попытку поймать и др.).

Патологоанатомическое вскрытие рыбы предусматривает вскрытие брюшной полости на наличие видимых паразитов и изменений органов.

Его осуществляют в лаборатории, используя живую или только что уснувшую рыбу. Живую рыбу обязательно обездвигивают, используя специальные анестезирующие препараты, из которых наиболее доступно гвоздичное масло. В случае отсутствия анестезирующих препаратов рыб обездвигивают посредством перерезания ножницами позвоночника у основания головы. Анестезия приводит и к обездвигиванию некоторых эктопаразитов, что затрудняет их дальнейшее обнаружение. Другой вариант для рыб небольшого размера. При помощи препаровальной иглы, которую вводят сверху через черепную коробку, разрушая продолговатый отдел мозга, или ножницами делают затылочный разрез (рис. 1), в результате чего головной мозг отделяется от спинного.

Брюшную полость рыбы вскрывают при помощи трех разрезов (рис.2). Сначала скальпелем прокалывают стенку брюшной полости несколько выше и впереди анального отверстия. В прокол вставляют тупой конец ножниц и делают первый разрез, который проходит вдоль брюшка параллельно его средней линии и кончается за основанием

грудных плавников. Вторым полукруглым разрезом отсекают стенку брюшной полости, обнажая внутренние органы. С помощью третьего разреза вдоль головы отделяют стенку брюшной полости и убирают ее в сторону. Разрезы делают осторожно, чтобы не повредить внутренние органы. Вскрытие осетровых проводят отделяя брюшко, делая два разреза вдоль рядов брюшных жучек и третий - вдоль головы, отсекая брюшную стенку.

Патологоанатомический осмотр начинают с брюшной полости (рис. 2), обращая внимание на ее содержимое, наличие жидкости (ее количество, цвет и консистенцию) или газа, запаха, крупных полостных паразитов. Затем изучают внешний вид внутренних органов: наличие кровоизлияний, отеков, новообразований. После осмотра извлекают комплекс внутренних органов и осторожно отделяют их друг от друга. По внешним признакам: размеру, цвету, структуре, кровенаполнению и другим определяют их состояние.

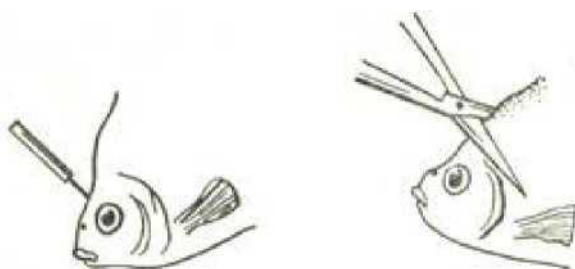
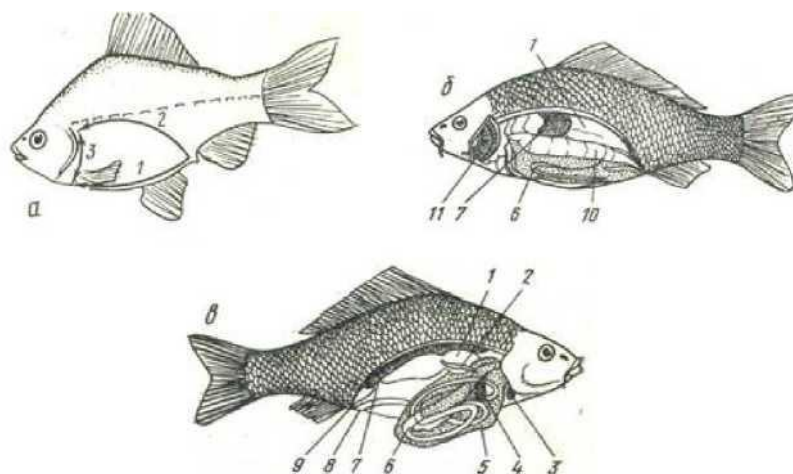


Рисунок 1- Обездвиживание рыбы препаровальной иглой и ножницами



а – схема вскрытия; б, в – расположение внутренних органов;
 1 – плавательный пузырь; 2 – воздушный ход; 3 – сердце; 4 – селезенка;
 5 – печень; 6 – кишечник; 7 – почки; 8 – анальное отверстие; 9 – мочевой
 пузырь; 10 – половая железа; 11 – жабры

Рисунок 2 – Вскрытие брюшной полости рыб

Выделение и осмотр внутренних органов рыбы проводят в определенном порядке. Если половые железы хорошо развиты и заполняют большее пространство брюшной полости, то сначала выделяют и просматривают их, а затем, как и у неполовозрелых рыб, в следующей последовательности: 1) желчный пузырь; 2) печень; 3) селезенка; 4) желудочно-кишечный тракт; 5) половые железы (у неполовозрелых рыб); 6) плавательный пузырь; 7) почки; 8) мочевой пузырь; 9) сердце; 10) глаза; 11) головной мозг; 12) мускулатура. Органы раскладывают по чашкам Петри и смачивают дистиллированной водой.

Желчный пузырь. Определяют степень его наполнения и размер. Разрезают стенки пузыря и осматривают желчь, ее цвет, прозрачность и консистенцию.

Печень. Устанавливают ее форму, окраску, консистенцию, а также наличие кровоизлияний, светлых участков и цист.

Селезенка. Отмечают размеры, цвет, структуру, наличие кровоизлияний, рубцов, цист.

Желудочно-кишечный тракт. Осторожно расправляют его, освобождая от жировой ткани, и ножницами делают разрез вдоль кишечника. При наличии пищи ее осторожно убирают, обращая внимание на степень ее переваренности, цвет, запах, присутствие крупных гельминтов. Кишечник промывают в воде и по отделам просматривают слизистую оболочку. Отмечают ее цвет, общее состояние, то есть наличие кровоизлияний, язв, отеков, истончений, рубцов и т. д.

Половые железы. Обращают внимание на размер, стадию зрелости, цвет, кровоизлияния и другие аномалии.

Плавательный пузырь. Определяют форму, величину, состояние оболочек, их толщину, прозрачность, наличие кровоизлияний, жидкости, гемосидерина и других признаков воспаления.

Почки. Просматривают все три отдела почек: головной, туловищный и хвостовой, обращая внимание на их форму, окраску, консистенцию, степень кровенаполнения.

Мочевой пузырь. Его обычно выделяют вместе с мочеточниками. Для этого скальпелем отделяют мочеточники от других тканей, отсекают их от почек и, поднимая осторожно пинцетом, подходят к мочевому пузырю. Его освобождают от близлежащих тканей и пинцетом переносят в чашку Петри. Отмечают состояние оболочек мочеточников и мочевого пузыря, их утолщение, кровоизлияния, а также цвет и прозрачность мочи.

Сердце. Ножницами разрезают соединительнотканную перегородку сердечной полости и отсекают сердце. Описывают его размер, форму и степень наполнения полостей. Разрезают предсердие и желудочек и отмечают особенность крови, наличие сгустков.

Глаза. Из глазной впадины извлекают глазное яблоко, кладут его в солонку и аккуратно разрезают. Извлекают хрусталик, стекловидное тело и содержимое передней и задней камер глаза раскладывают на предметные стекла и изучают отдельно.

Головной мозг. Вскрывают черепную коробку с помощью 4 разрезов ножницами или скальпелем (рис. 3). Первый поперечный разрез проходит по заднему краю затылочной кости. Два продольных разреза идут с боковых сторон к соответствующей носовой ямке. Четвертым разрезом вырезанные кости убирают и осторожно удаляют ткань, покрывающую головной мозг. Сначала головной мозг осматривают, не вынимая из черепной коробки, а затем вынимают и, разрезая на доли, характеризуют состояние мозговых оболочек, вещества мозга, кровенаполнение сосудов.

Мускулатура. При осмотре скелетной мускулатуры обращают внимание на ее цвет, консистенцию, наличие кровоизлияний, отеков, опухолей, цист, а также на степень прикрепления к костям. Все отклонения, отмеченные при вскрытии, записывают в рабочую тетрадь, а затем отмечают в акте эпизоотологического обследования. Органы, имеющие патологические отклонения, дополнительно обследуют паразитологическими, бактериологическими, вирусологическими методами.

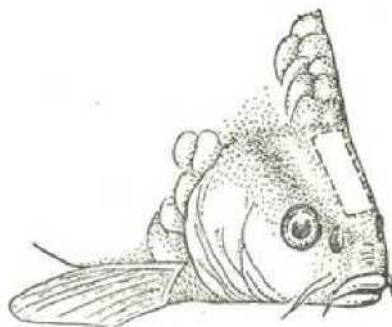


Рисунок 3- Схема вскрытия черепной коробки

Лабораторная работа № 2 «Диагностическое значение гематологических показателей и их определение»

Цель работы:

1. Определение места гематологических показателей в контроле за здоровьем рыб.
2. Изучение особенностей отбора крови у рыб разного вида и возраста.
3. Освоение методов гематологического анализа.

Материал и оборудование: живая рыба, набор инструментов для вскрытия, пастеровские пипетки или шприц с инъекционной иглой, часовое стекло, 5% раствор натрия цитрата или раствор гепарина 1000 ЕД/мл (7,7 мг/мл), спирт, марля, вата, микроскоп с набором объективов x8, x40, 90, x100, кюветы для окраски мазков крови, камера Горяева, фотоэлектроколориметр, гематокритная центрифуга, обезжиренные предметные стекла, иммерсионное масло, счетчик для дифференцированного подсчета лейкоцитов, анестезирующее вещество. Стеклянная посуда и необходимые реактивы описаны ниже при описании методов определения конкретных показателей.

Задание:

1. Освоить разные методы отбора крови у рыб.
2. Провести определение гематологических показателей, входящих в комплекс гематологического анализа.
3. Записать в тетрадь полученные результаты и оценить состояние здоровья взятых на анализ рыб.

Теоретическая часть

Контроль за здоровьем рыб базируется на оценке их физиологического состояния. Одним из методов такой оценки является гематологический анализ. В настоящее время в дифференциальной диагностике болезней рыб наряду с паразитологическими, микробиологическими, вирусологическими исследованиями немаловажное значение приобретают исследования крови рыб. При интенсивных технологиях выращивания рыбы, при которых наряду с инвазионными и инфекционными заболеваниями возникает ряд незаразных болезней, в том числе и водные токсикозы, диагностировать которые из-за отсутствия возбудителя значительно труднее.

Гематологические показатели позволяют оценить физиологическое состояние рыбы, выявить влияние того или иного заболевания на ее организм, определить тяжесть

течения болезни, прогнозировать ее исход. На рыбоводных заводах по искусственному воспроизводству перед выпуском молоди проводят оценку ее физиологической полноценности и жизнеспособности по гематологическим показателям, включая эти данные в рыбоводный стандарт.

В ихтиопатологии гематологический анализ включает определение следующих показатели крови: 1) содержание гемоглобина, 2) гематокритную величину, 3) число эритроцитов, 4) скорость оседания эритроцитов, 5) содержание гемоглобина в одном эритроците, 6) средний диаметр эритроцитов, 7) общее число лейкоцитов, 8) дифференциальный подсчет лейкоцитов, т. е. лейкоцитарную формулу и лейкоцитарный профиль. В лабораторной гематологической диагностике принято считать, что первые шесть показателей характеризуют так называемую картину красной крови, то есть связанную с эритроцитами, а остальные два – белую, то есть лейкоцитов.

Изменения в показателях крови условно подразделяют на количественные и качественные. Количественные изменения проявляются как в увеличении, так как в уменьшении величины гематологических показателей по сравнению с физиологической нормой. Качественные изменения связаны с нарушением соотношения различных групп форменных элементов крови (как эритроцитов, так и лейкоцитов), а также с их патологическими изменениями. Дифференцировать клетки крови рыб достаточно сложно. Для этого используют атласы клеток крови (Иванова, 1970; Изергина и др., 2015).

Показатели красной крови позволяют диагностировать в организме анемический процесс. Анемией, или малокровием, называют состояние организма, характеризующееся уменьшением количества гемоглобина, гематокрита, числа эритроцитов и другими неспецифическими изменениями.

В развитии анемии у рыб И. Н. Остроумова выделила три стадии. Для I стадии характерно небольшое уменьшение количества гемоглобина и числа эритроцитов. В крови отмечено до 46% незрелых форм эритроцитов. Для II стадии характерны резко уменьшенное содержание гемоглобина и число эритроцитов (до 85%) В III стадии на фоне низких показателей гемоглобина, гематокрита и числа эритроцитов в крови отмечены лишь зрелые и разрушающиеся формы эритроцитов.

Резкое увеличение числа эритроцитов, или эритроцитоз, обычно сопровождается притоком в периферическую кровь молодых форм эритроцитов, поэтому этот процесс может протекать без уменьшения числа эритроцитов, но с понижением гемоглобина (полихроматофильная, базофильная анемия, гиперхромазия).

Количество лейкоцитов имеет важное диагностическое значение. Так как они принимают активное участие в защитных механизмах, то есть в воспалительных реакциях и иммунитете. Резкое увеличение числа лейкоцитов характеризуется как лейкоцитоз, а уменьшение их числа называется – лейкопенией. Диагностическое значение некоторых показателей крови дано в Приложении 7.

Краткая характеристика показателей крови некоторых видов рыб приведена ниже при описании конкретных методик их определения.

1. Методы взятия крови у рыб. Кровь для исследования рыб можно брать различными способами: из сердца, жаберной вены, хвостовой артерии и др. Выбор способа зависит от вида и размера рыбы, объема крови, необходимого для анализа.

Посуда и оборудование. Часовое стекло, инъекционная игла, скарификатор, пастеровская пипетка, глазная пипетка, ножницы, скальпель, марлевые салфетки, вата, кювета для вскрытия, живая рыба.

Реактив. 96°-ный спирт.

Взятие крови из сердца с помощью шприца или пастеровской: пипетки. Место укола при этом способе взятия крови у форели находится в середине отрезка, соединяющего основания правого и: левого грудных плавников, а у карпа – несколько выше этой точки (рис. 4). Рыбу фиксируют, завернув в марлевую салфетку. Место укола освобождают от слизи сначала сухим, а затем смоченным в спирте ватным тампоном.

Иглу для инъекций или пастеровскую пипетку вводят в место укола под углом 45° относительно фронтальной плоскости рыбы. При попадании в сердце кровь начинает обильно поступать в пастеровскую пипетку или иглу. Кровь из пастеровской пипетки выдувают в часовое стекло и используют для проведения необходимых опытов.

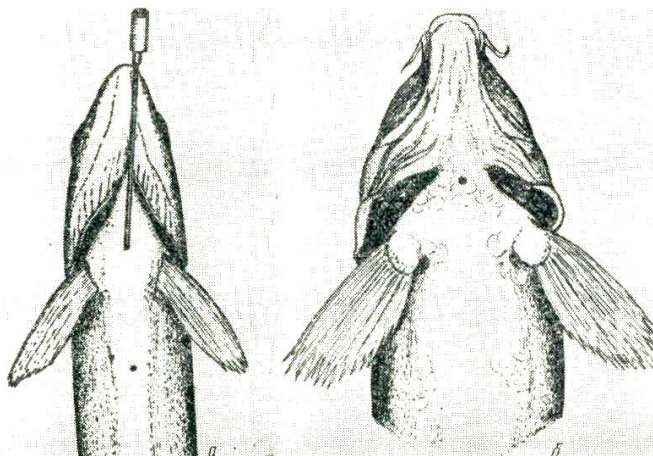


Рисунок 4 - Место взятия крови из сердца:

а - форель; б - карп

Из хвостовой артерии кровь берут с помощью шприца или пастеровской пипетки. У сеголетков карповых место прокола находится в точке, образовавшейся при условном пересечении средней линии и линии, идущей от анального отверстия перпендикулярно средней линии; у карповых рыб старших возрастных групп оно находится в точке пересечения средней линии и линии, идущей от задней границы анального плавника перпендикулярно средней линии (рис. 5). У лососевых прокол делают в области заднего края анального плавника перпендикулярно позвоннику, а у осетровых в области анального плавника, между брюшными жучками (рис. 6).

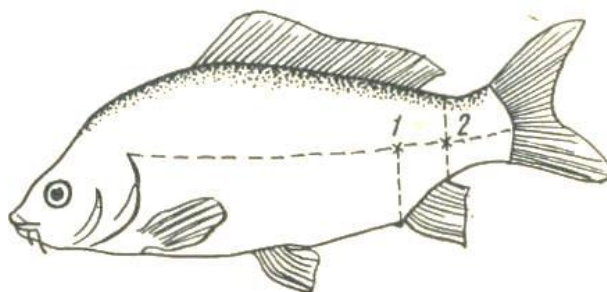


Рисунок 5 - Место взятия крови из хвостовой артерии у сеголетков (1), рыб старших возрастных групп (2)



Рисунок 6 - Отбор крови из хвостовой артерии у осетровых

Рыбу вынимают из воды и заворачивают в марлевую салфетку, освободив хвостовой стебель. Место прокола скальпелем освобождают от чешуи, а затем сначала сухим, а потом смоченным в спирте ватным тампоном тщательно вытирают от слизи. Иглой для инъекций впередот позвоночника делают прокол под углом 45° до упора. Через иглу в часовое стекло собирают поступающую кровь. Для взятия крови этим способом можно использовать пастеровскую пипетку. В этом случае вначале в месте взятия делают укол скарификатором, затем в образовавшееся место укола отверстие вставляют, медленно вращая, пастеровскую пипетку и собирают кровь для анализа.

Взятие крови *путем отсечения хвостового стебля*. Рыбу вынимают из воды и обездвиживают. Срезают спинной и анальные плавники, заворачивают в марлевую салфетку, освободив хвостовой стебель. Скальпелем снимают чешую с хвостового стебля. Сначала сухим, а затем смоченным в спирте ватным тампоном снимают с поверхности тела слизь. Ножницами отсекают хвостовой стебель по медиальной линии сзади анального плавника (рис. 18,2). Кровь собирают в культе хвоста, держа рыбу вверх головой.

2. Приготовление и окраска мазков крови. Существует несколько способов окраски мазков крови. Выбор их зависит от поставленных задач. Для дифференциального подсчета форменных элементов и точной их идентификации в ихтиопатологии используют комбинированную окраску мазков крови по Паппенгейму.

Посуда и оборудование. Заранее приготовленные обезжиренные, сухие, матированные предметные стекла, шлифованное стекло для изготовления мазков крови, штатив и кювет для окраски мазков крови, простой карандаш.

Реактивы. Раствор Май-Грюнвальда, рабочий раствор азурзозина по Романовскому (готовые реактивы имеются в продаже), дистиллированная вода с pH 6,81. Воду нейтрализуют фосфатными буферами (приложение 8).

Ход определения. В левую руку между большим и указательным пальцем берут обезжиренное предметное стекло (рис. 7). Пастеровской пипеткой из него рядом с матированным концом наносят маленькую каплю крови. Большим и указательным пальцами правой руки берут шлифованное стекло за боковые ребра, ставят на предметное стекло под углом 45° и подвигают тыльной стороной к капле, которая от соприкосновения растекается. Скользящим движением продвигают шлифованное стекло вперед. Кровь должна равномерно распределяться по предметному стеклу в виде мазка (рис. 8), На матированном участке стекла записывают сведения о рыбе, ее возрасте, указывают место

и дату изготовления мазка, фамилию исследователя. Мазки ставят в штатив для окраски мазков и высушивают на воздухе (рис. 9). Сухие мазки погружают в кювету аппарата с раствором Май-Грюнвальда. По истечении 5 мин мазки вынимают и промывают в дистиллированной воде с рН 6,81 в течение 1 – 2 мин. Мазки докрашивают в рабочем растворе Романовского в течение 25 – 30 мин (качество окраски клеток необходимо контролировать под малым увеличением микроскопа). Окрашенные мазки промывают водопроводной водой и высушивают: на воздухе.

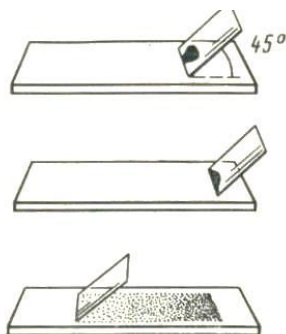


Рисунок 7 - Приготовление мазка крови

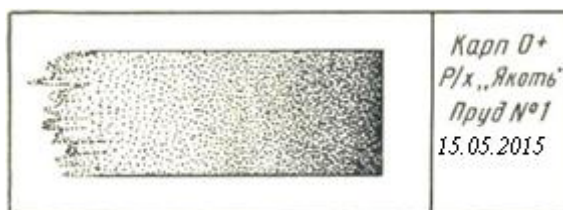


Рисунок 8 - Правильно приготовленный мазок крови

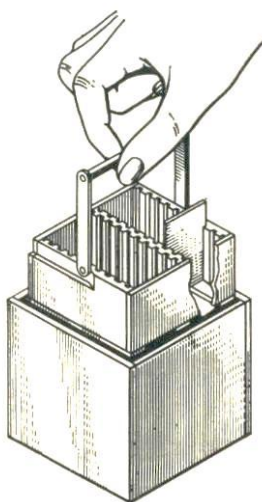


Рисунок 9 - Штатив и кювет для окраски мазков крови

3. Оценка эритроцитарной картины крови рыб. Клетки эритроидного (красного) ряда у различных видов рыб морфологически более сходны между собой, чем лейкоциты. Родоначальными клетками красного ряда являются эритробласты (рис. 10). Это клетки округлой формы с резко базофильной (ярко-синей) гомогенной цитоплазмой. Крупное красно-фиолетовое ядро расположено в центре и содержит четко контурированные зерна

хроматина клетки. В ядре имеются ядрышки, вокруг ядра – перенуклеарное пространство. Следующей стадией созревания являются базофильные нормобласты. Это клетки формы. Цитоплазма окрашена в синий цвет, но слабее, чем у эритробластов. Резко очерченные, грубо пятнистые ядра красно-фиолетового цвета расположены в центре. Полихроматофильные нормобласты овальной формы. В связи с тем что в цитоплазме этих клеток появляется гемоглобин, она окрашивается в грязно-розовый цвет. Хроматин ядра группируется, и его контуры приобретают отчетливую колесовидную форму и структуру. Оксифильные нормобласты – клетки овальной формы с гомогенной оранжевой цитоплазмой. Округлое красно-фиолетовое ядро с характерным резко контурированным рисунком хроматина и ахроматина расположено в центре клетки. Эритроциты отличаются от своей предыдущей стадии лишь характерной эллипсоидной формой. По соотношению молодых и зрелых форм эритроцитов оценивают активность кроветворения (эритропоэза).

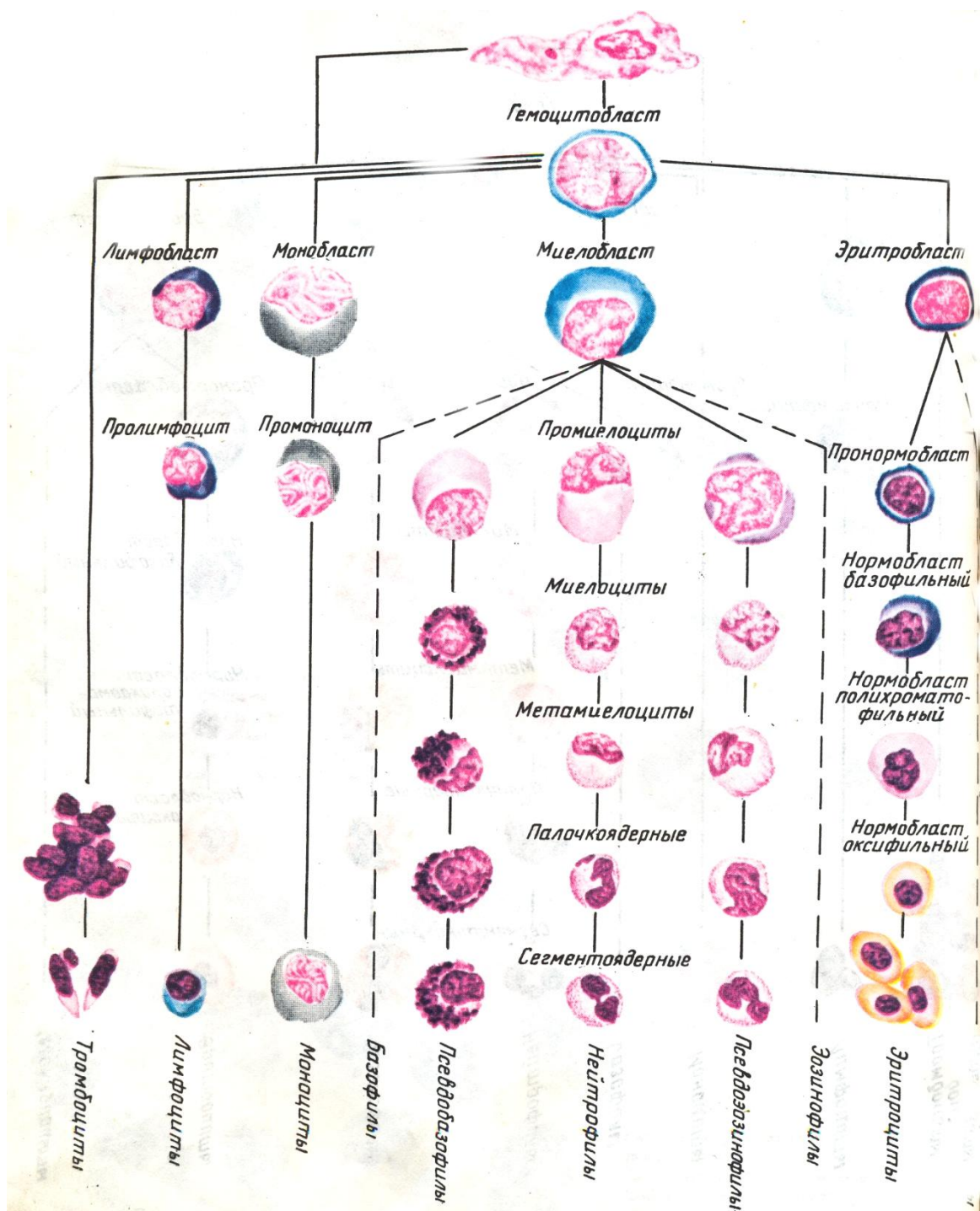


Рисунок 10 - Схема – классификация форменных элементов крови костистых рыб, по Ивановой, 1970.

Посуда и оборудование. Микроскоп МВБ, окрашенные по Паппенгейму мазки крови, лабораторный счетчик для дифференциального подсчета клеток крови

Ход определения.

Устанавливают микроскоп, подбирают освещение. Окрашенные мазки крови просматривают под микроскопом МВБ, сначала под малым, а затем под иммерсионным объективом. Необходимо просмотреть не менее 1000 эритроцитов. Для этого мазок просматривают в 4 различных его участках по 250 клеток эритроидного ряда в каждом. Найденные клетки следует рассмотреть, зарисовать и идентифицировать, т. е. определить стадию созревания эритроцита (рис. 23) или используя «Атлас клеток крови рыб»

(Иванова, 1970, Изоргина и др., 2015). Подсчет проводят с использованием лабораторного счетчика для дифференциального подсчета клеток крови и выводят процент различных стадий созревания эритроцитов:

$$X = (A \cdot 100) / 1000 = A \cdot 0,1\%,$$

где А — число незрелых эритроцитов, встретившихся при подсчете 1000 эритроцитов;

Х — искомый процент незрелых эритроцитов.

4. Определение гематокритной величины. Гематокритная величина, или гематокрит, т. е. отношение объема эритроцитов к общему объему крови, выражают в литрах на литр (л/л). 1 л/л равен 100%. Величина гематокрита у двухлетков карпа в норме равна 0,36 – 0,44, пестрого толстолобика – 22-24, радужной форели – 40-42, ленского осетра – 22 – 24л/л.

Посуда и оборудование. Микрокапилляры и гематокритная центрифуга (рис.11).

Реактивы. Растворы антикоагулянтов (веществ, препятствующих свертыванию крови), раствор гепарина 1000 ЕД/мл или раствор Геллера и Пауля, содержащий в 100 мл воды 1,2 г щавелевокислого аммония и 0,8 г щавелевокислого калия.



А



Б

Рисунок 11. Микрокапиллярная центрифуга:

А – внешний вид; Б – диск, предназначенный для размещения микрокапилляров.

Ход определения. Микрокапилляры предварительно обрабатывают раствором антикоагулянта. Для этого их несколько раз споласкивают в растворе гепарина и высушивают при комнатной температуре или в капилляр насасывают на 1/7 часть раствор Геллера и Пауля и высушивают в сушильном шкафу при 60°C. В подготовленные капилляры набирают кровь. Конец капилляра закупоривают с помощью замазки или специальных резиновых колпачков и центрифугируют до получения постоянного объема эритроцитов. Время вращения зависит от скорости вращения центрифуги.

Учет результатов. Отсчет объема эритроцитов и плазмы можно производить при помощи миллиметровой линейки. Отношение столба эритроцитов к высоте всего столба крови является гематокритной величиной.

5. Определение содержания гемоглобина. Гемоглобин – это дыхательный пигмент, содержащийся в эритроцитах. Его количество имеет важное диагностическое значение. Определение гемоглобина ведется на фотоэлектроколориметрах (ФЭК) (рис.12), спектрофотометрах или специализированных гемоглобинометах. Количество

гемоглобина, содержащегося в крови, выражают в г/л. У двухлетков карпа в норме равен 86 – 104, пестрого толстолобика – 74-87, радужной форели – 84- 100, ленского осетра – 60 -84 г/л.



Рисунок 12 - Фотоэлектроколориметр

Определение гемоглобина цианметгемоглобиновым фотометрическим методом.

Посуда и оборудование. Фотоэлектроколориметр (ФЭК) или спектрофотометр, зеленый светофильтр, рабочие кюветы толщиной 1 см, химические пробирки с пробками, микрокапиллярная пипетка на 20 мкл, градуированная пипетка вместимостью на 5 мл.

Реактивы. Трансформирующий раствор Драбкина, содержащий в 1 л; 1) бикарбонат натрия – 1 г; 2) красную кровяную соль – 0,2 г; 3) цианистый калий или натрий – 0,05 г, 4) дистиллированную воду остальной объем.

Ход определения. Мерной пипеткой в пробирку (осторожно!) наливают 5 мл трансформирующего раствора. Микропипеткой добавляют 20 мкл крови. Затем ополаскивают ее путем попеременного насыщения и выдувания жидкости. Содержимое пробирки хорошо перемешивают и оставляют в холодильнике не менее чем на 20 мин. Включают ФЭК. По истечении этого времени рабочий и трансформирующий растворы наливают в рабочие кюветы и, используя зеленый светофильтр, проводят измерения.

Учет результатов. Расчет концентрации гемоглобина (в г/л) на основе данного определения производят по формуле

$$X = D_{540} \cdot 367,1, \text{ г/л,}$$

где D_{540} – показания ФЭК;

367,1 – коэффициент пересчета, учитывающий разведение крови, миллимолярный вес гемоглобина и другие показатели.

6. Определение числа эритроцитов. Число эритроцитов (млн./мкл или $T \cdot \text{л}^{-1}$) важный показатель для характеристики патологического процесса. Особенно велика его роль в диагностике анемий. Например, у здоровых двухлетков карпа число эритроцитов равно 0,94 – 1,4 ,0, пестрого толстолобика – 1,2 – 1,6, радужной форели – 1,1 – 1,4, ленского осетра – 0,5-0,6 млн. /мкл.

Посуда и оборудование. Химические пробирки с пробками, градуированные пипетки на 5 мл, пастеровская пипетка, микрокапиллярная пипетка на 20 мкл, камера Горяева, микроскоп МВБ.

Реактивы. 0,85%-ный раствор хлористого натрия.

Ход определения. Градуированной пипеткой в химическую пробирку наливают 4 мл раствора хлористого натрия. Микрокапиллярной пипеткой набирают кровь 20 мкл и выдувают в пробирку, осторожно промывая содержимое по несколько раз. Покровное стекло притирают к камере Горяева до появления ньютоновских колец. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и пастеровской пипеткой заполняют камеру Горяева.

Через 1-2 мин начинают подсчет числа эритроцитов под микроскопом обычным способом в 5 больших или в 80 малых квадратах, расположенных по диагонали (рис. 13).

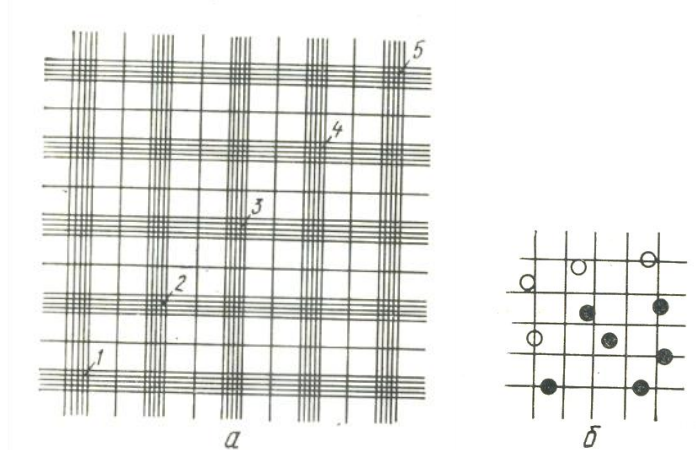


Рисунок 13 -. Принцип подсчета эритроцитов в камере Горяева:

а - расположение 5 квадратов для подсчета эритроцитов; б - схема расположения эритроцитов в квадрате (темные учитывают, светлые – нет)

Учет результатов. Количество эритроцитов в 1 мкл определяют по формуле

$$X = (Л \cdot 4000 \cdot 200) / 80,$$

где X – количество эритроцитов в 1 мкл крови (млн/мкл);

А – количество эритроцитов, определенное в 80 малых квадратах;

4000 – множитель, приводящий результат к объему 1 мкл;

200 – рабочее разведение;

80 – число просчитанных квадратов.

Для упрощения подсчетов количества эритроцитов в 1 мкл достаточно умножить число эритроцитов, определенное в 80 квадратах (А), на 10000.

7. Определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ). В зависимости от физических и химических свойств крови, которые меняются при воспалительных процессах, эритроциты оседают в микрокапиллярах с различной скоростью. Скорость оседания эритроцитов (в мм/ч) определяют в аппарате Панченкова (рис. 14). Например, скорость оседания эритроцитов у здоровых двухлетков карпа равна 2-4 мм/ч.

Посуда и оборудование. Часовое стекло, аппарат Панченкова, состоящий из штатива и специальных капиллярных пипеток. На пипетках нанесена миллиметровая шкала длиной 10 см. Верхнее деление шкалы отмечено «0» и буквой «К» (кровь). Против деления 50 имеется буква «Р» (реактив).

Реактив. Профильтрованный 5%-ный раствор трехзамещенного лимоннокислого натрия.

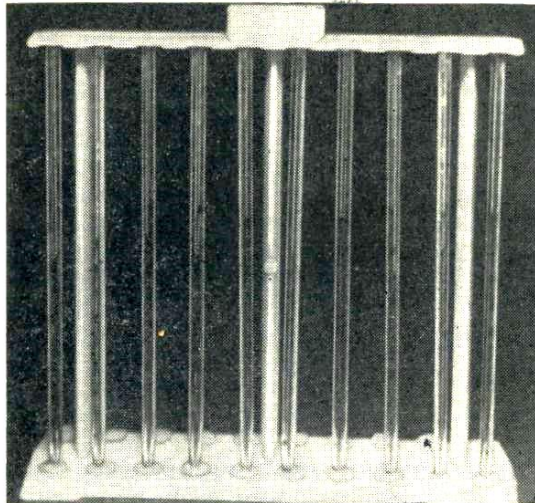


Рисунок 14 - Аппарат Панченкова

Ход определения. Промывают капиллярную пипетку раствором лимоннокислого натрия. Набирают раствор лимоннокислого натрия до метки «Р» и спускают в часовое стекло. Этим же капилляром набирают 2 раза кровь до метки «К» и спускают в часовое стекло. Смесь хорошо перемешивают и набирают в капилляр до метки «К». Протерев кончик капилляра ватой, его ставят в штатив аппарата Панченкова на 1 ч.

Учет результатов. Скорость оседания эритроцитов определяют по делениям на капиллярной пипетке. Учитывают величину столбика плазмы, освободившуюся от эритроцитов. Скорость оседания эритроцитов у рыб колеблется в пределах 4 – 10 мм/ч.

8. Знакомство с морфологией лейкоцитов и их дифференциальный подсчет. Морфологические особенности лейкоцитов зависят от вида рыб. Классификация клеточных элементов (рис. 23) учитывает эти особенности.

В крови рыб различают 7 групп лейкоцитов на различных стадиях цитогенеза: 5 групп гранулоцитов, родоначальником которых является миелобласт (нейтрофилы, эозинофилы, псевдоэозинофилы, базофилы, псевдобазофилы), и 2 группы агранулоцитов (моноциты и лимфоциты). Кроме того, в крови встречаются бластные формы, т. е. родоначальные клетки (гемоцитобласт, миелобласт, промиелоцит). Нейтрофилы, как и другие гранулоциты, в своем цитогенезе проходят 4 стадии: миелоцит, метамиелоцит, палочкоядерную и сегментоядерную формы, которые также должны учитываться. Таким образом, в крови карпа можно дифференцировать до 29 форм лейкоцитов.

Гемоцитобласты. Нежное красно-фиолетовое ядро занимает почти всю клетку. В ядре просматриваются ядрышки. На долю нежно-голубой цитоплазмы приходится незначительная часть. Скопление этих клеток отмечали в очагах гемопоэза. Слабобазофильная цитоплазма миелобластов окружает нежно-сетчатое ядро более широким слоем, чем у предыдущей стадии. Клетка крупная. В ядре имеются ядрышки. В периферической крови эти клетки очень редки.

Промиелоциты. Клетки овальной формы значительно больших размеров, чем предыдущие стадии. Эксцентрично расположенное нежное красно-фиолетовое ядро содержит ядрышки. У более поздних стадий в цитоплазме видна специфическая зернистость.

Нейтрофильные гранулоциты. В цитоплазме содержат мелкую, почти бесцветную специфическую зернистость. В цитогенезе проходят 4 стадии, которые различают по структуре и форме ядра, у миелоцитов оно относительно круглое, рыхлое, красно-фиолетового цвета, у метамиелоцитов более плотное, эксцентрично расположенное, овальное или слегка вытянутое. Палочкоядерные формы имеют красно-фиолетовое, продолговатое, часто почкообразное ядро. У сегментоядерных форм оно, как правило, рассечено на две доли или на большее число сегментов, тогда такие клетки называют полиморфоядерные.

Эозинофильные гранулоциты (эозинофилы). Округлые клетки с плотным, овальным или круглым ядром. Цитоплазма заполнена плотно лежащими гранулами с абсолютной ацидофилией. У псевдоэозинофилов в цитоплазме находятся мелкие игольчатые гранулы малинового цвета. Ядро округлое. В цитоплазме базофилов в небольшом количестве содержатся крупные одинакового размера гранулы красно-фиолетового цвета. Ядро округлой или овальной формы, красно-фиолетового цвета. Псевдобазофилы по форме ядра и клетки близки к эозинофилам, однако резко отличаются от них по зернистости. Вся цитоплазма псевдобазофилов заполнена разнородной красно-фиолетовой зернистостью.

Незернистые лейкоциты (агранулоциты). Преобладают лимфоциты, имеющие различную форму – округлую, овальную или вытянутую. Темно-синяя цитоплазма узким кольцом окружает плотное красно-фиолетовое ядро. Цитоплазма может быть едва заметной, тогда клетки кажутся как бы «голаядерными». Моноциты имеют эксцентрично расположенное круглое красно-фиолетовое ядро округлой, вытянутой или лопастной формы с характерным рисунком. Гомогенная цитоплазма серовато-голубоватого цвета.

При различных патологических состояниях организма рыб, в том числе и при заболеваниях, в крови можно встретить морфологически измененные клеточные элементы (как эритроциты, так и лейкоциты) (рисунок 15).

Гиперсегментация ядра. Ядро разделяется на несколько соединенных между собой сегментов.

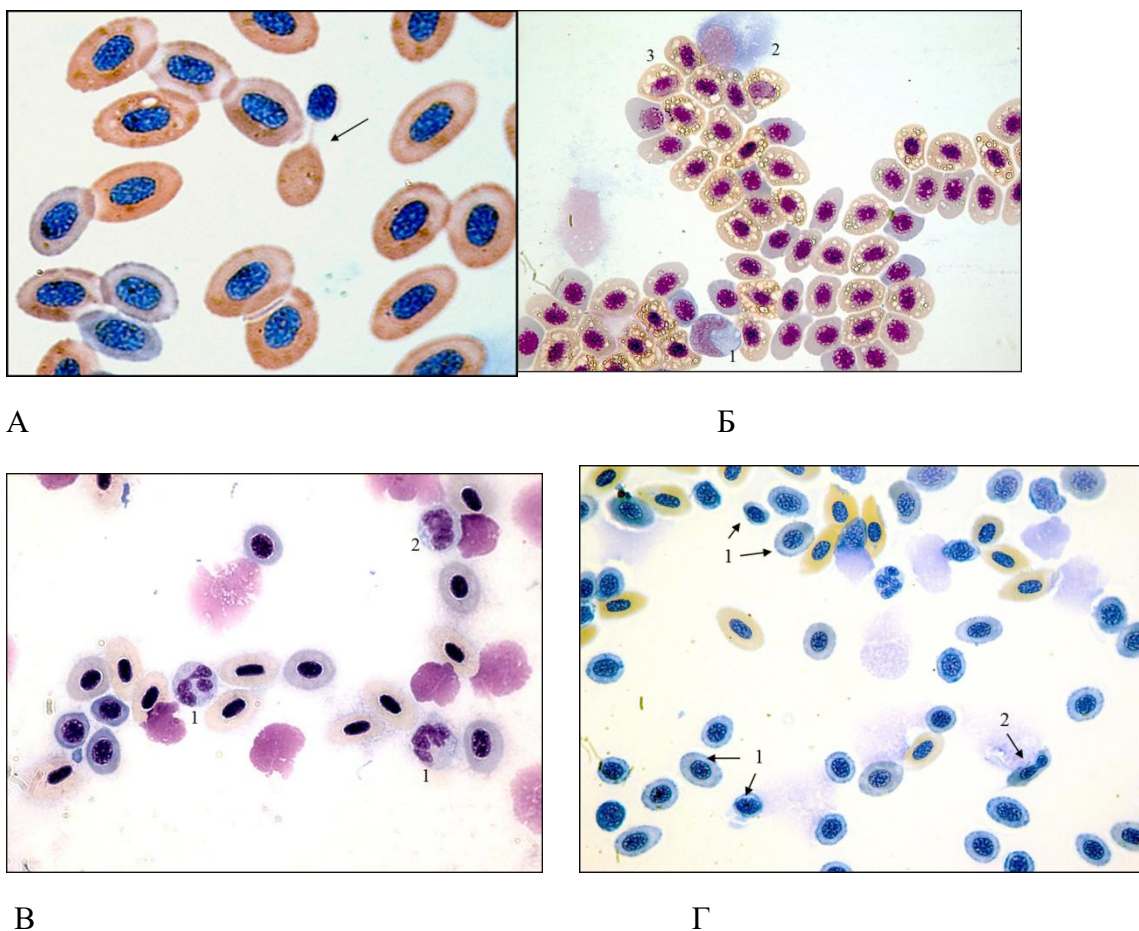


Рисунок 15- Морфологически измененные клетки крови рыб: А -Безъядерный эритроцит,

Б - Вакуолизация эритроцитов, В - гемолиз эритроцитов, Г– Разноразмерные нормобласты (1), патологическое деление эритроцита (2)

Хроматинолиз. Возникает при распаде хроматина, который теряет свою нормальную структуру, растворяется. Ядро окрашивается в светлый цвет, контуры его сохраняются.

Кариолиз. Растворение лишь части ядра с сохранением его нормальной структуры. В местах растворения ядро теряет способность окрашиваться. Контуры его нечеткие, размытые.

Пикноз. Уплотнение хроматина ядра. Ядро становится темным, бесструктурным. Процесс пикнотизации распространяется либо на все ядро, либо на отдельные его участки.

Кариорексис. Распад ядра на отдельные части обычно сочетается с пикнозом. При этом образуются не связанные между собой округлые бесструктурные темно-вишневые образования.

Цитолиз, или лизис. Распад клетки. Цитоплазма может отсутствовать. Ядро теряет свою обычную структуру, контуры его расплывчатые.

Вакуолизация. Встречается как в ядре, так и в цитоплазме. Возникает в связи с расстройством внутриклеточного обмена. Наличие ее в ядре указывает на тяжесть патологического процесса. Вакуолизация может сочетаться с другими структурными изменениями клеток.

Изменение зернистости у гранулоцитов. Возникает при различных заболеваниях. При этом могут меняться форма, размеры и цвет гранул.

Соотношение различных групп лейкоцитов в крови отражает лейкоцитарная формула. При заболеваниях она не дает полного представления об истинной картине белой крови, поэтому, определив процентное соотношение отдельных видов клеток, вычисляют их абсолютное значение.

Посуда и оборудование: микроскоп, лабораторный счетчик для дифференциального подсчета клеток крови, мазки крови, окрашенные по Паппенгейму. атласы клеток крови рыб.

Реактив. Иммерсионное масло.

Ход определения. Мазок крови просматривают под иммерсией (x 90, x100). Найденные лейкоциты зарисовывают и идентифицируют, используя рис. 22 и атласы клеток крови рыб (Иванова, 1970; Изергина и др., 2015).

Найденные лейкоциты регистрируют на счетчике для дифференциального подсчета клеток крови (рис. 16). Эта счетная машинка суммирует все дифференциально отмеченные лейкоциты и дает сигнал (в виде звонка) о подсчете 100 или 200 клеток. Для ихтиопатологических целей подсчитывают 200 лейкоцитов и лишь при большой лейкопении допускается просчитывать 100 клеток.

Учет результатов. Лейкоцитарную формулу крови выводят, исходя из результатов подсчета лейкоцитов. Она отражает соотношение различных групп лейкоцитов в процентах по формуле: $X = (A \cdot 100)/200$,

где X –доля определяемой группы клеток в лейкоцитарной формуле, %;

A – количество этих клеток, найденное при подсчете 200 клеток (по показанию счетчика).

Пример. Вывести процент нейтрофилов в лейкоцитарной формуле карпа, если при подсчете 200 клеток на счетчике указано 12 шт. Нейтрофилы в лейкоцитарной формуле составляют: $(12 \cdot 100)/200 = 6\%$.



Рисунок 16 - Лабораторный счетчик для дифференциального подсчета клеток крови.

Вычисление абсолютного значения различных групп лейкоцитов 1 мкл крови проводят по формуле пересчета: $X = (A \cdot B) / 100$,

где X – абсолютное значение определяемой группы лейкоцитов, шт./мкл;

A – ее процентное значение в лейкоцитарной формуле, %;

B – общее число лейкоцитов в 1 мкл, тыс. шт./мкл; (его определение дано в этой лабораторной работе далее).

100 – общий процент всех лейкоцитов в лейкоцитарной формуле, %.

Пример. Общее число лейкоцитов в 1 мкл крови равно 60 тыс., из них 70% составляют лимфоциты. Определить абсолютное число лимфоцитов в крови.

Абсолютное число лимфоцитов в 1 мкл крови равно $(70 \cdot 60000) / 100 = 42$ тыс./мкл.

9. Определение общего числа лейкоцитов косвенным методом.

Посуда, оборудование и реактивы те же, что в разделе 8.

Ход определения. В четырех различных участках мазка подсчитывают, используя счетчик для дифференциального подсчета клеток крови, число лейкоцитов, приходящихся на 250 эритроцитов. Полученные цифры суммируют и получают число лейкоцитов, встретившихся при подсчете 1000 эритроцитов в мазке крови.

Учет результатов.

Число лейкоцитов в 1 мкл крови определяют по формуле

$$X = (A \cdot B) / 1000,$$

где X — общее количество лейкоцитов в 1 мкл крови (тыс./мкл);

A – число эритроцитов в 1 мкл крови, определенное в камере Горяева (раздел 6 в данной работе);

B – число лейкоцитов при подсчете 1000 эритроцитов в мазке крови.

Пример. На 1 тыс. эритроцитов в мазке крови приходится 50 лейкоцитов.

Определить общее количество лейкоцитов в 1 мкл, зная, что у обследованной рыбы количество эритроцитов составило 1,0 млн/мкл.

Имеющиеся данные подставляем в формулу

$$X = (1\,000\,000 \cdot 50) / 1000 = 50\,000 \text{ лейкоцитов в 1 мкл крови или } 50 \text{ тыс./мкл}$$

Ход работы:

1. Ознакомиться с теоретической частью работы.

2. Провести отбор крови у рыб разными методами и изготовить мазок крови.
3. Определить содержание гемоглобина, гематокрит, СОЭ, число эритроцитов и лейкоцитов и лейкоцитарную формулу у объекта исследования.
4. Записать в тетрадь полученные результаты проведенного гематологического анализа рыбы.

Контрольные вопросы

1. Для каких целей определяют гематологические показатели у рыб?
2. Какие показатели характеризуют картину красной крови?
3. Какие показатели характеризуют картину белой крови?
4. Каковы качественные и количественные изменения в картине крови?
5. Что такое анемия? Как она проявляется?
6. Перечислите основные методы взятия крови у рыб.
7. Что такое гематокритная величина?
8. В каком аппарате определяют скорость оседания эритроцитов?
9. Что легло в основу классификации лейкоцитов?
10. На какие две группы делятся лейкоциты? Каковы их особенности?
11. Сколько групп гранулоцитов определяют в крови костистых рыб? Перечислите их.
12. Какой признак является определяющим при идентификации лейкоцитов? Приведите пример.
13. По какой формуле подсчитывается общее число лейкоцитов?
14. Что такое лейкоцитарная формула?
15. По какой формуле подсчитывается абсолютное число различных групп лейкоцитов?

Лабораторная работа №3-4. Контроль за состоянием здоровья рыб. Эпизоотологическое обследование рыбоводных предприятий и рыбохозяйственных водоемов

Цель работы: 1. Ознакомиться с делопроизводством и документооборотом по охране здоровья рыб на рыбоводном предприятии.

2. Освоить навыки составления актов эпизоотологического обследования рыбоводных предприятий и рыбохозяйственных водоемов.

Материалы и оборудование:

Образцы ихтиопатологического журнала, ветеринарного свидетельства, акта эпизоотологического обследования рыбоводного предприятия, актов о гибели рыбы, акта эпизоотологического обследования рыбохозяйственного водоема.

Задание:

1. Ознакомиться с теоретической частью и ходом работы.
2. Ознакомиться с документами по делопроизводству и документооборотом по болезням рыб, используемым на рыбоводных предприятиях.
3. Записать в тетрадь схему составления актов эпизоотологического обследования рыбоводных предприятий или рыбохозяйственных водоемов.

Теоретическая часть

Эпизоотологическое обследование – один из методов диагностики болезней рыб, позволяющих изучить течение заболевания, собрать анамнез, выяснить причину ее возникновения, динамику развития и пути распространения.

Для возникновения болезни в водоеме необходимо наличие источника заразного начала, факторов передачи возбудителя и восприимчивых организмов. Источником заразного начала в водоеме в большинстве случаев является больная рыба, выделяющая в воду возбудителей заболевания. Элементы внешней среды, которые способствуют передаче возбудителя от больной рыбы к здоровой, называются факторами передачи. К ним относятся рыба, икра, вода и почва водоемов, птицы, беспозвоночные, а также рыбоводный инвентарь, орудия лова и т. д. Очень часто проявлению и распространению болезней способствуют и другие причины. Наиболее значимым из них являются перевозки посадочного материала и оплодотворенной икры для рыборазведения. Факторы провоцирующие возникновение болезни или усиливающие его называются стрессорами, или стресс-факторами. К ним относятся резкое изменение температуры, нарушение гидрохимического режима, воздействие на рыб токсикантов, переуплотненные посадки, плохое качество корма, обловы рыбы и др.

Эпизоотическая ситуация по заболеваниям культивируемых рыб в стране нестабильная и весьма напряженная. Экономический ущерб от болезней рыб в мировой аквакультуре может составлять 15-20%. В соответствии с Федеральным законом РФ "О ветеринарии" от 14.05.1993. № 4979 (www.mcx.ru), руководители рыболовных предприятий обязаны своевременно обеспечивать контроль за состоянием здоровья рыб, проведение мероприятий по профилактике и ликвидации болезней рыб.

На рыболовном предприятии делопроизводство и документооборот, связанный с контролем за здоровьем выращиваемой рыбы, имеет свои требования. Эту работу проводят специалисты хозяйства. Они ведут следующие документы: 1 - регулярно заполняют журнал ихтиопатологического состояния рыболовного хозяйства, журнал учета гидрохимических показателей, журнал учета гибели; 2 – составляют годовой план проведения лечебно-профилактических мероприятий; 3 - ведут делопроизводство, то есть сохраняют в отдельных папках акты эпизоотологического обследования рыболовного хозяйства, ветеринарные свидетельства о завозе рыбы или икры с целью рыборазведения, акты о гибели рыбы, акты о проведении ветеринарно-санитарных и лечебно - профилактических мероприятий, сертификаты на используемые в хозяйстве комбикорма, удобрения, дезинфекционные средства и лечебные препараты. Работа проводится в тесном контакте с районными ветеринарными специалистами.

Ихтиопатологический журнал заполняют на всех рыболовных предприятиях (прудовое, садковое, озерно-товарное, рыбопитомник, нерестово-выростное, репродуктор, племрассадник, рыболовный завод) или их отделениях (участок, рыбцех, рыбхоз), если они находятся на другом источнике водоснабжения. Он заполняется ихтиопатологом или главным рыболовом хозяйства и является постоянно действующим документом.

Журнал состоит из 7 разделов. В разделе I даются общие сведения о рыболовном предприятии прилагается схематический план-карта хозяйства с нанесенными на ней прудами и сельскохозяйственными угодьями.

В разделе II указывают санитарное состояние хозяйства: зарастаемость водной растительностью, состояние гидротехнических сооружений, заболоченность, заиленность, наличие бочагов, спускные и неспускные пруды, а также заносят данные о проводимых мероприятиях по дезинфекции и дезинвазии с указанием конкретных дат проведения и объема работ (площадь обработанных прудов; количество обработанных садков, инкубационных аппаратов, бассейнов, лотков и др.).

В разделе III (рыбоводно-мелиоративные мероприятия) указывают видовые и возрастные посадки рыб (тыс. шт./га); проводимые мелиоративные работы; устройство и восстановление на прудах водосборной и осушительной сети канав (в м); засыпка бочагов

на ложе прудов; засев прудов сельскохозяйственными культурами и травами; вспашка и культивирование ложа прудов.

В разделе IV (эпизоотическое состояние хозяйства) регистрируют заболевания, время возникновения болезней, гибель рыбы (в штуках и %), причины возникновения болезни.

В разделе V (лечебно-профилактические мероприятия в хозяйстве) указывают название препарата, метод обработки, количество обработанной рыбы, каким методом ведется оздоровление хозяйства (летование, комплексный). Эффективность применяемых препаратов и методов.

В этот раздел заносят данные о проведении весной и осенью при пересадках, соответственно на нагул и зимовку, профилактической обработки племенного и рыбопосадочного материала (количество обработанных рыб и чем проведена обработка).

Раздел VI (сведения о завозе племенного и рыбопосадочного материала) заполняют при поступлении материала.

В разделе VII (гидрохимические данные) заносятся результаты полного гидрохимического анализа на основании лабораторных исследований, выполненных в сертифицированных лабораториях, занимающихся качеством воды.

Результаты ежедневного контроля за температурой воды и содержанием кислорода во всех прудах и рыбоводных емкостях заносятся в специальный гидрохимический журнал, при этом обязательно приводятся данные по поступающей и сбросной воде. Один раз в год, а так же в случаях массовой гибели рыб, выполняется полный гидрохимический анализ поступающей воды.

Регулярный контроль за здоровьем рыб, включающий клинический осмотр, патологоанатомическое вскрытие и неполный паразитологический анализ проводится в прудовых хозяйствах при контрольных обловах. В вегетационный период их проводят на выростных прудах 2 раза в месяц, на нагульных - еженедельно. Обследование рыбы из садков и бассейнов проводят аналогично, но просмотр и учет погибшей рыбы проводится ежедневно. Данные о погибшей рыбе заносятся в специальный журнал учета погибшей рыбы, а также составляется акт о гибели. Акты хранятся в отдельной папке, а итоговые цифры гибели заносятся в журнал о гибели рыбы и ихтиопатологический журнал.

Государственные ветеринарные инспектора, проводя мониторинг эпизоотологического состояния хозяйства, посещают предприятия 2 раза в год, а так же в случаях возникновения заболевания.

По результатам контрольного облова и ихтиопатологического обследования рыбы составляется акт эпизоотологического обследования рыбоводного хозяйства. Он пишется в произвольной форме, но включает ряд обязательных данных. Пример составления такого акта вынесен в Приложение 3. Акты эпизоотологического состояния хозяйства хранят в отдельной папке, а основные выводы или результаты заключения заносят в ихтиопатологический журнал.

Для предупреждения заноса в хозяйство или водоем возбудителей заразных заболеваний, в соответствии с ветеринарным законодательством, осуществляется систематический контроль за перевозками живой рыбы, икры и других гидробионтов, в частности кормовых беспозвоночных. Завоз можно проводить только при наличии Ветеринарного свидетельства. Оно выдается главным государственным ветинспектором района, в нем указывается эпизоотическое благополучие рыбоводного хозяйства - репродуктора и условия перевозки живой рыбы с целью рыборазведения, в соответствии с «Инструкцией по ветеринарному надзору за перевозками живой рыбы, оплодотворенной икры, раков и других водных организмов» (Сборник..., 1998). На каждую партию перевозимой рыбы и икры необходимо иметь ветеринарное свидетельство или ветеринарную справку, если перевозка осуществляется внутри района. Образец ветеринарного свидетельства представлен в Приложении 4. Все ветеринарные свидетельства о завозе рыбы в хозяйство

сохраняют в отдельной папке.

В рыбоводные хозяйства и рыбохозяйственные водоемы и завозят рыб, выловленных только из водоемов и хозяйств, благополучных по инфекционным и инвазионным болезням. Из хозяйств, неблагополучных по вирусной виремии карпа, аэромону, бранхиомикозу, фурункулезу, миксосомозу (вертеж форели), вирусным болезням лососевых рыб и другим заболеваниям, при которых предусмотрено карантинирование, запрещается вывоз не только рыбы, но и икры и беспозвоночных. При других заболеваниях на водоем или рыбоводное предприятие накладывают ограничения и вопрос о перевозках решается в соответствии с действующей инструкцией по борьбе с этими болезнями. Рыба, пораженная эктопаразитами (например, хилодонеллами, гиродактилюсами и др.), может быть допущена к перевозке, только после соответствующей тщательной противопаразитарной обработки.

Во всех случаях рыба допускается к перевозке только после выборочного ихтиопатологического обследования нескольких экземпляров из отправляемой партии, оценки физиологического состояния и соответствия размерно-весовому стандарту. Плотности посадки, температура воды и содержание кислорода в воде, т.е. условия перевозки, должны соответствовать физиологическим потребностям рыбы.

Особое внимание уделяется качеству проводимых оздоровительных мероприятий. Все мероприятия проводятся согласно годового плана проведения лечебно-профилактических мероприятий, о составлении которого более подробно будет изложено в лабораторной работе № 34.

Органам ветеринарного надзора вменено в обязанности проводить мониторинг эпизоотического состояния и рыбохозяйственных водоемов, выявлять эпидемиологически- и эпизоотическиопасных возбудителей. Эту работу они проводят в тесном контакте с ветеринарными и рыбохозяйственными научными институтами.

В случаях гибели рыб в этих водоемах создается специальная комиссия, которая, прежде всего, собирает анамнез, т. е. проводит опрос рыбаков-любителей, местного населения и других очевидцев, для выяснения эпизоотической ситуации. Проводит ихтиопатологический анализ рыбы, отбирает пробы для дальнейших лабораторных исследований и составляет акт эпизоотологического состояния обследуемого водоема. В акте отражают причины гибели, рассчитывается ущерб, и разрабатываются возможные меры по ликвидации очага заболевания. Акт составляется в произвольной форме.

Ход работы:

1. Ознакомиться с образцами документов имеющихся на рыбоводном предприятии и касающихся болезней рыб.
2. Записать в тетрадь перечень основных входящих и хранящихся на рыбоводном хозяйстве документов.
3. Заполнить образец акта эпизоотического обследования рыбохозяйственного водоема или рыбоводного предприятия.

Контрольные вопросы

1. Какие документы по делопроизводству и документообороту по охране здоровья рыб имеются на рыбоводном предприятии?
2. Из каких частей состоит «Ихтиопатологический журнал»?
3. Какова основная цель эпизоотологического обследования рыбоводного хозяйства?
4. Как часто проводят контрольные обловы и ихтиопатологическое обследование выращиваемой рыбы?
5. Что такое анамнез?
6. Какие документы изучаются при эпизоотологическом обследовании рыбоводного хозяйства?
7. Кто выдает разрешение на ввоз и вывоз рыбы из рыбоводного хозяйства?

8. Какой документ является обязательным при перевозке рыбы?
9. Кто составляет акт эпизоотологического обследования рыбохозяйственного водоема?

Лабораторная работа № 5. Профилактика болезней рыб на рыбоводных предприятиях

Цель работы:

1. Ознакомление с нормативной базой по профилактике болезней рыб на рыбоводных предприятиях.
2. Изучение особенностей организации и проведения профилактических мероприятий в рыбоводных хозяйствах.
3. Приобретение навыков расчета профилактической обработки икры.
4. Приобретение навыков расчета доз дезинфектантов, используемых в рыбоводстве.

Материалы и оборудование

Нормативные документы: Ветеринарное законодательство, Сборники по борьбе с болезнями рыб (1998;1999,) примерный план профилактических мероприятий в рыбоводных хозяйствах, обучающая компьютерная программа по ихтиопатологии.

Задание:

1. Ознакомиться с нормативными документами и примерным планом проведения ветеринарно-санитарных и профилактических мероприятий для рыбоводных хозяйств.
2. Составить план ветеринарно-санитарных и профилактических мероприятий для определенного типа рыбоводного хозяйства (прудовое, промышленное, садковое, УЗВ и т.д.).
3. Рассчитать потребность в препаратах для проведения профилактической обработки инкубируемой икры.
4. Рассчитать потребность в дезинфектантах для проведения профилактических мероприятий в рыбоводном хозяйстве, исходя из п.2 настоящего задания.

Теоретическая часть

Профилактика или предохранение - это комплекс мероприятий, направленных на предупреждение возникновения заболеваний и сохранение здоровья рыб. Она является основным путем решения проблемы борьбы со многими опасными инфекциями и инвазиями.

В соответствии с законом РФ "О ветеринарии" от 14.05.1993 № 4979 (www.mcx.ru/navigation/page/show/334.htm) руководители рыбоводных предприятий обязаны своевременно обеспечить проведение мероприятий по профилактике болезней рыб. Делопроизводство по болезням рыб предполагает составление и выполнения на рыбоводном хозяйстве годового плана проведения ветеринарно-санитарных и профилактических мероприятий и актов о проведении ветеринарно-санитарных и лечебно-профилактических мероприятий. Работа проводится в тесном контакте с районными ветеринарными специалистами.

Одним из гарантов благополучия рыбоводного хозяйства по заразным болезням является регулярное проведение **профилактических мероприятий**. Они состоят из комплекса рыбоводно-мелиоративных и ветеринарно-санитарных работ. *Рыбоводно-мелиоративная* часть входит в общий технологический процесс и включают такую работу с рыбой, которая повышает ее общую резистентность, способствует повышению устойчивости ее к возбудителям заразных заболеваний и неблагоприятным факторам среды. К ним относятся:

1. Создание оптимальных условий для выращиваемых рыб, включая контроль за качеством воды.
2. Зарыбление качественным посадочным материалом.

3. Соблюдение оптимальной плотности посадки рыб, включая поликультуру, с учетом кормовой базы, условий кормления рыб, гидрохимического режима и эпизоотического состояния хозяйства.

4. Кормление качественными сбалансированными гранулированными кормами.

5. Создание оптимального гидрологического и гидрохимического режима, в том числе удобрение прудов.

6. Селекционно-племенная работа, направленная на выбраковку производителей и их подбор по принципу «лучший к лучшему».

7. Мелиоративные работы, включая устройство и восстановление водоподающей и водосбросной систем, борьбу с зарастаемостью прудов, водоподающих каналов, промораживание и просушивание ложа прудов.

Ветеринарно - санитарные мероприятия, согласно «Рекомендаций по планированию и проведению противоэпизоотических мероприятий» (Сборник борьбы с болезнями рыб, 1998), составляются в виде годового плана, и утверждаются директором предприятия и согласовываются с главным ветеринарным инспектором района.

В благополучных по заразным болезням рыб хозяйстве в плане имеется только 1 раздел "Общие ветеринарно-санитарные и профилактические мероприятия", а в неблагополучных по какому-либо заболеванию - к этому плану добавляется 2-ой раздел "Специальные мероприятия по борьбе с заразными заболеваниями", в который включают конкретные мероприятия по борьбе с имеющимися на хозяйстве заразными болезнями, согласно существующих инструкций и наставлений.

Примерный план проведения комплекса ветеринарно-санитарных и профилактических мероприятий, рекомендуемый для составления на рыбоводных хозяйствах, представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Образец для составления ежегодного плана ветеринарно-санитарных и профилактических мероприятий

Согласовано: _____ Утверждаю: _____
 Главный ветинспектор района Директор рыбного хозяйства
 ФИО _____ ФИО _____
 « ____ » _____ 20__ г. « ____ » _____ 20__ г.

План
 проведения ветеринарно-санитарных и профилактических мероприятий
 на 20__ г. в рыбоводном хозяйстве _____

п/п	Наименование мероприятий	Сроки исполнения	Ответственные исполнители
Общие ветеринарно-санитарные и профилактические мероприятия			
1.	Мониторинг эпизоотического состояния хозяйства. Контроль за качеством воды и используемых комбикормов. Клинический осмотр и паразитологические исследования рыбы всех возрастных групп при контрольных обловах.	Регулярно в течение года	Ихтиопатолог и рыбоводы хозяйства, ветеринарные специалисты
2.	Контроль за перевозками ремонтно-маточного стада, посадочного материала и оплодотворяемой икры.	При завозе	Госветинспектор района, специалисты хозяйства
3.	Карантинное передерживание завозимой рыбы для формирования ремонтно-	При завозе	Специалисты хозяйства

	маточного стада в карантинных или специальных прудах (или бассейнах) для передержки рыбы сроком не менее 30 дней при температуре воды не ниже 12°C.		
4.	Профилактическая обработка рыбы при перевозках четырехкомпонентной смесью непосредственно в транспортной таре.	При перевозках	Ихтиопатолог, специалисты хозяйства
5	Профилактическая обработка рыбы органическими красителями, малахитовым зеленым, формалином, поваренной солью в соответствии с утвержденными инструкциями и наставлениями.	Регулярно, ежемесячно или ежедекадно в течение года	Ихтиопатолог хозяйства
6.	Профилактическая обработка инкубируемой икры.	Во время инкубации	Ихтиопатолог хозяйства
7.	Профилактическая дезинфекция: - рыбоводных емкостей (лотков, бассейнов) ; -инкубационных аппаратов; - прудов.	Регулярно в течение года По окончанию рыбоводного сезона	Специалисты хозяйства
8.	Для повышения общей резистентности и профилактики заболеваний, сопряженных со стрессом (миксобактериоз, бактериальная геморрагическая септицемия, жаберный некроз и др.) проводят курс кормления с пробиотиками.	Регулярно в течение года	Ихтиопатолог, специалисты хозяйства
9.	Сбор и утилизация трупов рыб, выяснение причин гибели.	Регулярно	Ихтиопатолог и рыбоводы хозяйства, ветеринарные специалисты

Правильное планирование противоэпизоотических мероприятий возможно лишь на основе всестороннего анализа эпизоотического состояния хозяйства за несколько предшествующих лет.

В обязательном порядке в план мероприятий по профилактике заболеваний должны войти диагностические исследования рыбы, а так же проведение полного гидрохимического и бактериологического анализа воды.

Профилактическую обработку икры проводят при ее инкубации. Особенности обработки зависят от вида инкубируемой икры и заболевания.

Икру лососевых видов рыб, включая форель, для профилактики сапролегниоза и особо опасных инфекций (инфекционного некроза гемопоэтической ткани, вирусной геморрагической септицемии, фурункулеза), обрабатывают сразу перед помещением в инкубационные аппараты. Рамки с икрой погружают в лечебные растворы препаратов обрабатывают раствором формальдегида (5 мл/л) в течение 3 минут, хлорамином-Б в концентрации 0,05 мг/л в течение 30 минут или иодиолом в концентрации 1 мг/л с

экспозицией 10 минут (при обработке иодином показателем рН должен быть не выше 6,5-7,5).

При появлении сапролегнии в ходе инкубации пораженные икринки осторожно отбирают, утилизируют. На стадии образования глазка обрабатывают в растворе формальдегида 3 минуты, малахитового зеленого 60 мг/л – 10-30 секунд с интервалом в 10 дней.

Профилактическую обработку икры карповых проводят раствором фиолетового «К» (5 мг/л) в течение 30 мин. при температуре воды 16-20°C на вторые сутки от начала инкубации.

Профилактическую обработку икры осетровых проводят раствором (10 мг/л) фиолетового «К» в течение 30 мин. Кратность обработок зависит от вида осетровых рыб. Икру осетра и севрюги обрабатывают двукратно: на 16 и 22 стадиях – для икры осетра и на 16-17 и 26 – для икры севрюги, а икру белуги трехкратно с двухдневным интервалом, т.е. на 16, 22 и 28 стадиях развития.

Икру белорыбицы обрабатывают раствором фиолетового «К» (5 мг/л) в течение 30 мин. четырехкратно: на второй, третий, шестой – седьмой и тридцатый дни от начала инкубации. Икру лососевых перед помещением в инкубационные аппараты обрабатывают 0,5 % раствором формальдегида в течение 3 мин., позднее - на стадии глазка - обработку повторяют.

Обработка икры лечебным раствором. Для профилактической обработки большого количества икры фиолетовым «К» и другими препаратами в инкубационных цехах изготавливают специальный бак, который устанавливают выше стойки с аппаратами. Из него по шлангам, находящимся в нижней части бака, рабочий раствор препарата самотеком поступает в инкубационные аппараты. Объем бака зависит от расхода воды в аппарате и времени обработки.

Расчет необходимого количества сухого препарата проводят по формуле:

$$X = \frac{V \times K \times 100}{C},$$

где: X – необходимое количество препарата в мг;

V – объем бака в литрах или необходимое количество воды для приготовления лечебного раствора;

K – рабочая концентрация раствора в мг/л;

C – концентрация сухого препарата в %, указанная на маркировке тары.

Для приготовления рабочего раствора необходимое количество сухого препарата (фиолетового «К») тщательно растворяют в небольшом количестве воды, подогретой до 60°C, и затем выливают в бак. Температура рабочего раствора должна соответствовать температуре воды, подаваемой в аппарат. По истечению времени обработки шланги отсоединяют, и аппараты подключают к обычной чистой воде.

Расчет количества воды необходимого для приготовления лечебного раствора можно рассчитать исходя из расхода воды в обрабатываемых аппаратах и времени обработки по формуле:

$$V = P_v \times T,$$

где: P_v - расход воды в аппарате;

T - время обработки.

Пример расчета необходимого количества препаратов для обработки икры лечебным раствором.

Задание. Рассчитать необходимое количество фиолетового «К», для проведения профилактической обработки 10 инкубационных аппаратов с икрой сазана, если расход воды в аппарате 300 мл/мин., а концентрация препарата по сертификату – 40%.

Расчет.

Для решения задачи надо знать, что время обработки икры сазана 30 мин., а

концентрация лечебного раствора – 5 мг/л.

1. Находим какое количество лечебного раствора необходимо приготовить для всей обработки

$$300 \text{ мл/мин.} \times 30 \text{ мин.} \times 10 \text{ ап.} = 90000 \text{ мл} = 90 \text{ л}$$

2. Рассчитываем необходимое количество препарата на этот объем

$$5 \text{ мг/л} \times 90 \text{ л} \times 100\% : 40\% = 1125 \text{ мг} = 1,125 \text{ г}$$

Капельный метод обработки икры. Используют также методику капельной подачи маточного раствора лечебного препарата непосредственно в инкубационный аппарат без прекращения основного водообмена. Для проведения обработки необходима емкость для маточного раствора с дозирующим устройством, которую устанавливают на водоподаче.

Расчет необходимого количества препарата на все время обработки проводят по формуле:

$$X = \frac{K \times Pв \times T \times 100}{C},$$

где: X – необходимое количество препарата;

K – рабочая лечебная концентрация раствора, мг/л;

$Pв$ – расход воды в аппарате во время обработки, л/час.

T – время обработки, час.

C – концентрация сухого препарата в %, указанная в сертификате качества.

Из необходимого количества препарата готовят маточный раствор, который выливают в емкость с дозирующим устройством. Расход маточного раствора рассчитывают по формуле.

$$Pм = \frac{Vм}{T} (\text{л/час}) = 16,7 \times \frac{Vм}{T} (\text{мл/мин}),$$

где: $Pм$ – расход маточного раствора;

$Vм$ – объем маточного раствора, л или мл;

T – время обработки;

16,7 – показатель пересчета л/час в мл/мин.

Пример расчета необходимого количества препарата для обработки икры капельным методом.

Задание. Рассчитать необходимое количество препарата и расход маточного раствора фиолетового «К» при профилактической обработке икры сазана капельным методом от сапролегниоза в аппарате Вейса, если расход воды в аппарате 0,5 л/мин. Объем маточного раствора в емкости с дозирующим устройством 2 л.

Расчет.

Для решения задачи надо знать, что время обработки икры сазана 30 мин. (0,5 ч), а концентрация лечебного рабочего раствора в аппарате должна быть 5 мг/л.

1. Рассчитываем необходимое количество препарата на все время обработки:

$$(0,5 \text{ л/мин.} \times 30 \text{ мин.}) \times 5 \text{ мг/л} = 75 \text{ мг}$$

2. Рассчитываем расход маточного раствора

$$2 \text{ л} : 0,5 \text{ час} = 4 \text{ л/час} = 4 \times 16,7 = 66,8 \text{ мл/мин.} \approx 70 \text{ мл/мин.}$$

$$(2000 \text{ мл} : 30 \text{ мин.} = 66,8 \text{ мл/мин} \approx 70 \text{ мл/мин})$$

Профилактическую дезинфекцию и дезинвазию проводят регулярно в течении рыбоводного процесса, используя различные дезинфектанты: хлорная известь, негашеная известь, гипохлорит кальция, формалин, едкий натр, хлорамин-Б, перманганат калия. Их расход зависит от особенностей использования, доз, концентраций. Для расчета необходимых потребностей используют таблицу 2.

Таблица 2 - Дезинфектанты, применяемые в аквакультуре

Дезинфектант	Использование, расход или концентрация				
	по воде	по ложу прудов	рыбоводные емкости	транспортная тара	инвентарь
Хлорная известь	Пруды до 5 га 1-3 г/м ³ Пруды более 5 га 0,1-0,2 г/м ³	300-500 кг/га	5%	-	5%
Гипохлорит кальция	Пруды до 5 га 0,5-1,5 г/м ³ Пруды более 5 га 0,05-0,1 г/м ³	150-250 кг/га	1,5%	-	1,5%
Хлорамин Б	5-15 г/м ³	-	-	-	2 – 5 г/л
Негашеная известь	150-300 кг/га	2500 кг/га	10-20%	10-20%	10-20%
Формалин (40%)	-	-	4%	4%	2-4%
Едкий натр	-	3-5% 2-1 л/м ²	3% 0,5 л/м ²	-	3-5% расход 2-1 л/м ²
Марганцовокислый калий	10 г/м ³	-	0,5%	-	1г/л
ДЕЗАВИД	4 – 30 мг/л в зависимости от вида рыбы и окисляемости воды		3%	3%	3%

Примеры расчета необходимого количества дезинфектантов для профилактической обработки:

I. Прудов. Задание. Рассчитать необходимое количество негашеной извести для профилактической обработки ложа 5 прудов площадью 0, 5 га каждый.

Расчет:

Для решения задачи надо знать норму внесения по ложу прудов негашеной извести – 2500 кг/га.

1. Находим общую площадь всех прудов:

$$0,5 \text{ га} \times 5 = 2,5 \text{ га}$$

2. Находим необходимое количество негашеной извести:

$$2500 \text{ кг/га} \times 2,5 \text{ га} = 6250 \text{ кг} = 6,25 \text{ т.}$$

II. - Рыбоводных бассейнов. Задание. Обработать 10 рыбоводных бассейнов известковым молоком, если длина, ширина и высота 1 бассейна соответственно равны: 10, 5 и 2 м.

Расчет.

1. Определяем площадь всех поверхностей у 1 бассейна:

$$\text{Площадь дна} = 10 \times 5 = 50 \text{ м}^2$$

$$\text{Площадь торцевых стенок} = 2 \times 5 = 10 \times 2 \text{ стенки} = 20 \text{ м}^2$$

Площадь боковых стенок = 2 x 10 x 2 стенки = 40 м²

Всего площадь 1 бассейна = 50 + 20+40 = 110 м²

Площадь 10 бассейнов = 110 x 10 = 1100 м²

2. Учитывая, что расход известкового молока при обработке составляет 1 л на 1 м², находим необходимое количество известкового молока:

1100 м² x 1л/м² = 1100 л

Концентрация известкового молока из хлорной извести равна 5% или 50 г/л.

Всего потребуется хлорной извести = 50 г/л x 1100л = 55000 г = 55 кг

III. По воде прудов. Задание. Рассчитать необходимое количество хлорной извести при внесении по воде пруда площадью 40 га.

Расчет:

Для решения задачи надо знать, что при внесении хлорной извести по воде количество вносимого препарата зависит от площади пруда. В прудах площадью более 5 га концентрация препарата должна быть 0,1-0,2 г/м³.

1. Необходим объем воды в пруду:

Средняя глубина нагульных прудов – 1,5 м

Объем воды в пруду = 400000 м² × 1,5 м = 600000 м³

2. Находим необходимое количество хлорной извести:

0,1 г/м³ × 600000 м³ = 60000 г = 60 кг

или 0,2 г/м³ × 600000 м³ = 120000 г = 120 кг

После проведения ветеринарно-санитарных и профилактических мероприятий составляется акт (приложение 12), в котором указывается метод обработки, дезинфектант, концентрация, расход. Все акты хранятся в отдельной папке, по ним ведется учет и списание израсходованных дезинфектантов и лечебных препаратов.

Ход работы

1. Составить план ветеринарно-санитарных и профилактических мероприятий для виртуального рыбоводного хозяйства (по заданию преподавателя).
2. Ознакомиться с дезинфектантами, применяемыми в аквакультуре, и освоить методику расчета их потребности для рыбоводного хозяйства.
3. Используя обучающую компьютерную программу, провести расчет потребности в препаратах для профилактической обработке инкубируемой икры в виртуальном рыбоводном хозяйстве, исходя из п.1. или по приложению 13.
4. Используя обучающую компьютерную программу, провести расчет потребности в дезинфектантах для проведения профилактических мероприятий в виртуальном рыбоводном хозяйстве, исходя из п.1. или по приложению 13.

Контрольные вопросы:

1. Что понимают под термином «профилактика»?
2. Какие условия для выращивания рыб считаются оптимальными?
3. Какие мероприятия необходимы для предупреждения проникновения возбудителей в рыбоводное хозяйство?
4. Какие препараты используются в аквакультуре для проведения профилактической обработки инкубируемой икры?
5. Какие дезинфектанты используются в аквакультуре?
6. Как проводится расчет в потребностях дезинфектантов для рыбоводного хозяйства?
7. Каков порядок учета израсходованных дезинфектантов и лечебных средств в рыбоводном хозяйстве?

Лабораторная работа № 6 «Организация борьбы с болезнями рыб в рыбоводных хозяйствах различного типа.»

1. Ознакомление с нормативной базой по борьбе с болезнями рыб в рыбоводных хозяйствах
2. Изучение особенностей организации и проведения лечебных мероприятий в рыбоводных хозяйствах различного типа.
3. Приобретение навыков расчета доз лечебных препаратов для борьбы с болезнями рыб.

Материалы и оборудование

Нормативные документы: ветеринарное законодательство, сборники по борьбе с болезнями рыб (1998;1999,) обучающая компьютерная программа по ихтиопатологии.

Задание:

5. Ознакомиться с нормативной базой по борьбе с болезнями рыб в рыбоводных хозяйствах.
 1. Рассчитать потребность в препаратах для проведения лечебных мероприятий.
6. Рассчитать потребность в лечебных препаратах для борьбы с болезнями рыб при различных способах их применения.

Теоретическая часть

Терапию (от греч. *terapeia* – лечение) проводят при обнаружении заболевания. Любое заболевание легче предупредить, чем вылечить. Поэтому профилактика и терапия взаимосвязаны и дополняют друг друга. Проведение терапевтических мероприятий при возникновении заболеваний необходимо проводить в строгом соответствии с утвержденными Департаментов ветеринарии МСХ РФ инструкциями (Сборник инструкций., 1998; 1999). В неблагополучных по каким-либо заболеваниям рыбоводных хозяйствах при составлении ежегодного плана ветеринарно-санитарных и профилактических мероприятий (лаб. работа №34) добавляется 2-ой раздел "Специальные мероприятия по борьбе с заразными заболеваниями", в который включают конкретные мероприятия по борьбе с имеющимися заразными болезнями, согласно существующих инструкций и наставлений.

В случае возникновения на рыбоводном предприятии карантинного или особо опасного заболевания хозяйство объявляется неблагополучным и на него накладывается карантин или карантинные ограничения. Перечень карантинных и особо опасных заболеваний рыб определен Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ (Приказ №173 от 29.09.2005 г. «Об утверждении перечня карантинных и особо опасных болезней рыб»).

В перечень карантинных и особо опасных заболеваний рыб входят: аэромоноз карпа, весенняя виремия карпа, некроз поджелудочной железы лососевых, бактериальная почечная болезнь лососевых, фурункулез лососевых, бранхиомикоз, гиродактилез, воспаление плавательного пузыря, миксобактериозы, филометроидоз, вирусная геморрагическая септицемия лососевых и инфекционный некроз гемопоэтической ткани, ботриоцефалез, а также при возникновении болезней, ранее не регистрировавшихся на административной территории расположения хозяйства.

В случае наложения карантина разрабатывается перспективный план борьбы с этим заболеванием не менее чем на 2-3 года. Он включает лечебно-профилактические мероприятия по борьбе с карантинным заболеванием, направленные на полное оздоровление рыбоводного хозяйства. Мероприятия направлены на оздоровление рыбы, уничтожение окружающей среды, рыбоводных емкостей и от возбудителей особо опасного заболевания. В зависимости от заболевания, пруды могут выводиться на летование или зарыбляться. За неблагополучными прудами закрепляют рыбоводный инвентарь, который соответствующим образом дезинфицируют. Перевозки внутри хозяйства максимально сокращают. На всех прудах проводят комплекс оздоровительных мероприятий. Снятие карантина производится только решением главы администрации

района по представлению главным ветеринарным инспектором района материалов, свидетельствующих об оздоровлении хозяйства (выполнение плана оздоровительных мероприятий, заключение об отрицательных результатах при проведении диагностических исследований, актов эпизоотологического обследования).

В зависимости от типа рыбоводного хозяйства: прудовое, садковое, бассейновое, установки с замкнутым водообеспечением схема лечения рыбы остается одинаковой, но с учетом технологии рыборазведения появляются особенности в способах применения лечебных препаратов. В основном используются 3 способа: внесение лечебных препаратов в воду, скармливание и в виде инъекций.

1. Внесение лечебных препаратов в воду. Внесение лечебных препаратов в воду осуществляется в виде обработок в прудах, кратковременных обработок (ванны), длительных обработок в рыбоводных емкостях. Выбор таких обработок и их эффективность зависит от характера заболевания, общего физиологического состояния рыбы, технологических условий рыбоводного процесса и уровня рыбоводной культуры в данном хозяйстве. Используемые препараты, концентрации и дозировки приведены в Приложении 15.

Обработка рыбы в прудовых хозяйствах. В летний период лечебно-профилактические обработки возможны в нерестовых, маточных, а также в небольших по площади выростных прудах сравнительно небольших площадей. В нерестовых прудах для профилактики ихтиофтириоза применяют малахитовый зеленый в концентрации 0,1-0,2 г/м³. Обрабатываемая рыба должна находиться в таком растворе 4-5 ч, после чего возобновляют проточность или повышают уровень воды в пруду. В выростных прудах применяют хлорофос (против дактилогироза, аргулеза, лернеоза и др.) в концентрации от 0,1 г/м³ с внесением по всему зеркалу пруда или по береговой зоне, создавая там концентрацию 1,0 г/м³ без прекращения водоподачи (при рН воды до 8,0). Для детоксикации препарата на второй день после обработки по воде вносят негашеную известь 50-80 кг/га.

Для обработки рыбы в зимовалах (весной и осенью профилактически) применяют органические синтетические красители: основной ярко-зеленый (бриллиантовый зеленый) и основной фиолетовый «К», малахитовый зеленый в концентрации 0,15-0,2 г/м³. Красители вносят непосредственно в пруды при установлении постоянного водообмена. Необходимое количество красителя определяют по формуле:

$$m = \frac{V \times K \times 100}{C},$$

где m – необходимое количество препарата, г;

V – объем воды в пруду, м³;

K – рабочая концентрация красителя, г/м³ (0,15 или 0,20);

C – концентрация активно действующего вещества (АДВ) в сухом красителе, % (указана в сертификате качества).

Рассчитанное количество препарата растворяют в горячей воде (60-80°C), создавая маточный раствор красителя. Маточный раствор вносят равномерно по всему водному зеркалу прудов с помощью разбрызгивающих устройств (типа ДУК, ЛСД и др.).

При обработке рыбы подачу воды в прудах не прекращают. При температуре воды выше 15°C и рН более 8 обработку проводить не рекомендуется (особенно основным ярко-зеленым).

Для обработки рыбы с лечебной целью в зимний период по всей площади пруда делают во льду проруби, в которые равномерно разливают маточный раствор лечебного препарата: основного ярко-зеленого, малахитового зеленого и др. Основной ярко-зеленый используют в концентрации 0,1-0,15 г/м³. Трехкратно с интервалом через 2-3 дня. Малахитовый зеленый применяют из расчета 0,5 г/м³ при прозрачности воды 30-35 см (по диску Секки) или 0,9 г/м³ при прозрачности 10-15 см.

Метиленовый синий можно вносить в пруды из расчета 1,0-1,5 г/м³. Время обработки 5-6 дней, пока не адсорбируется краситель, после чего усиливают проточность.

Солевая обработка в зимовальных прудах проводится в течение 1-2 сут., причем в пруду создают концентрацию соли 0,1-0,2%. Солевую обработку проводят при температуре воды не ниже 1°C.

Пример расчета. Задание.

Рассчитать необходимое количество фиолетового «К», необходимого для профилактической обработки рыбы в пруду, если его концентрация 100%. Количество прудов -5, площади прудов – по 0,6 га, средняя глубина 2 м

Расчет:

Для решения задачи надо знать, что концентрация фиолетового «К» при обработке в прудах 0,2 г/м³.

1. Находим объем воды в 1 пруду:

$$6000 \text{ м}^2 \times 2 \text{ м} = 12000 \text{ м}^3$$

2. Находим объем воды во всех 5 прудах:

$$12000 \text{ м}^3 \times 5 = 60000 \text{ м}^3$$

3. Находим необходимое количество фиолетового «К»:

$$0,2 \text{ г/м}^3 \times 60000 \text{ м}^3 = 12000 \text{ г} = 12 \text{ кг}$$

Кратковременные обработки рыбы в ваннах. Для борьбы с эктопаразитами используют кратковременные ванны из поваренной соли, аммиака, марганцовокислого калия, формалина и других препаратов.

Солевые ванны применяют при температуре воды от 6 до 17°C для карпов и белых амуров и не выше 15°C для белых и пестрых толстолобиков. Обработка при более высоких температурах может приводить к гибели рыб. Проведения ее при низких температурах не дает нужного эффекта – большинство паразитов остается живыми. Концентрация солевых ванн 5%, длительность обработки 5 мин. В 100 л раствора можно обрабатывать 3-4 партии рыбы по 30 кг каждая. После обработки рыбу помещают на 2 ч в проточную воду и затем выпускают в пруд. Для молоди форели хороший антипаразитарный эффект дает использование 2-3% раствора соли в течение 15-20 мин.

Аммиачные ванны, особенно эффективные против дактилогирусов, применяют для обработки сеголетков и годовиков в концентрации 0,2%, а для племенного материала – 0,1%. препарат очень токсичен для рыб, по этому продолжительность обработки при температуре раствора 7-18°C – 1 мин, при 18-25°C – 30 с. Раствор для ванн готовят из нашатырного спирта (концентрация аммиака 24-29%) или водного раствора аммиака (концентрация 24-25%). В зависимости от нужной концентрации берут 1-2 мл нашатырного спирта или водного раствора аммиака на 1 л воды. Раствор готовят непосредственно перед обработкой рыбы. В одном и том же растворе обрабатывают не более 2-3 партий рыб и через 10-20 мин заменяют его новым. После аммиачных ванн рыбу сразу же выпускают в пруд или в чан с чистой водой.

Ванны из **марганцовокислого калия**, эффективные при аргулезе, лернеозе, сапролегниозе и других эктопаразитах, кроме осетровых рыб, готовят в разведении: 0,1 г/л при обработке 5-10 мин и 0,01 г/л (10 г/м³) при длительности обработки 60-90 мин. и 1 г/л при длительности обработки 20-45 с в виде аппликаций.

Формалиновые ванны для рыб старших возрастных групп применяют в разведении 1:1000 (1 мл 40%-ного формалина на 1 л воды) при обработке до 10-15 мин. Для младших возрастных групп (сеголетков, годовиков) применяют формалиновые ванны в разведении 200-500 мл/ м³, для ранней молоди – 100-300 мл/м³ при продолжительности обработки 30-40 мин.

Ванны из **малахитового зеленого**: 0,1-0,5 мг/л – 7 мин (для личинок лососевых); 1,0 мг/л – 20 мин; 0,5 мг/л 3-4 часа.

Пример. Задание.

Рассчитать необходимое количество аммиака для обработки 100 шт. производителей

толстолобика от дактилогироза, если средний вес рыбы 15 кг.

Расчет:

Для решения задачи надо знать, что лечебная (рабочая) концентрация аммиака 0,2% (2 мл жидкого аммиака на 1 л воды). При обработке в аммиачных ваннах одновременно купают не более 30 кг рыбы в 100л лечебного раствора, который после 3 партии заменяют.

1. Определяем вес всех производителей

$$15 \text{ кг} \times 100 \text{ шт.} = 1500 \text{ кг}$$

2. Находим, какое количество обрабатываемых партий следует сгруппировать из этой рыбы.

$$1500 \text{ кг} : 30 \text{ кг} = 50 \text{ партий}$$

3. Находим сколько раз придется, заменять лечебный раствор

$$50 \text{ партий} : 3 \text{ партии} = 16,6 \approx 17 \text{ раз.}$$

4. Определяем объем лечебного раствора

$$100 \text{ л} \times 17 = 1700 \text{ л}$$

5. Находим необходимое количество аммиака

$$2 \text{ мл/л} \times 1700 \text{ л} = 3400 \text{ мл} = 3,4 \text{ л}$$

Обработка рыбы в индустриальных хозяйствах. Антипаразитарная обработка рыбы в садках и бассейнах и установках с замкнутым водоснабжением (УЗВ) возможна несколькими способами. Выбор способа обработки зависит от типа хозяйства, возбудителя заболевания, вида и возраста рыбы, плотности ее посадки и физиологического состояния. При обработках лечебные препараты вносят в предварительно растворенном (маточный раствор) или сухом виде. В растворенном виде их используют с прекращения водообмена в рыбоводных емкостях или без его прекращения.

Особенности обработки рыбы, выращиваемой в лотках и бассейнах

При обработках лечебные препараты вносят в предварительно растворенном (маточный раствор) или сухом виде. В растворенном виде их используют с прекращения водообмена в рыбоводных емкостях или без его прекращения. С прекращением водообмена обработка проходит по типу ванн, то есть с малой экспозицией и высокой концентрацией лечебного препарата. Объем воды в лотках и бассейнах при этом можно уменьшить на 2/3, а воду аэрировать воздухом или кислородом. Маточный раствор препарата равномерно разбрызгивают по всей площади воды бассейна и перемешивают. Часть раствора вносят на приток. После окончания обработки водоподачу восстанавливают. Расчет необходимого количества препарата проводят по формуле:

$$m = \frac{V \times K \times 100}{C},$$

где m – необходимое количество препарата, г;

V – объем воды в бассейне или лотке, следует умножить на 1/3 м³;

K – рабочая концентрация препарата, г/м³;

C – концентрация активно действующего вещества (АДВ), % (указана в сертификате качества).

100 – пересчет на 100%

Пример расчета. Задание.

Рассчитать необходимое количество перманганата калия для обработки форели в бассейне от аргулеза, если объем воды в бассейне 10 м³.

Расчет:

Для расчета надо знать, что при обработке рыбы в лотках и бассейнах объем воды уменьшают до 1/3 и количество препарата рассчитывают на этот объем.

1. Находим рабочий объем воды в бассейне:

$$10 \text{ м}^3 : 3 = 3,3 \text{ м}^3$$

2. Рассчитываем необходимое количество препарата, зная, что лечебная концентрация перманганата калия 10 г/м³

$$10 \text{ г/м}^3 \times 3,3 \text{ м}^3 = 33 \text{ г}$$

Обработку без прекращения водообмена проводят с длительной экспозицией и относительно низкой концентрацией препарата. При этом рабочая концентрация лечебного препарата поддерживается благодаря постоянной подаче его в виде маточного раствора. Проведение такой обработки проводится капельным методом, аналогично той, которая подробно описана в разделе «Лечебно-профилактическая обработка икры» (лаб. работа №34).

Кроме того, в бассейны и садки лечебные препараты можно вносить с помощью аэрогидрогенизаторов, которые обеспечивают быстрое перемешивание воды с раствором. Для этого расчетное количество маточного раствора препарата заливают в бак из нержавеющей стали или пластика вместимостью около 100 л. Из него раствор подают через шланг и перфорированную трубку, уложенную на дно бассейна. Параллельно с ней располагают такую же трубку для подачи воздуха. При внесении раствора проводят барботаж воды воздухом.

Обработка в садках. При выращивании рыбы в садках водообмен в них определяется скоростью течения воды в водоеме, где они установлены, поэтому проведение в них указанных мероприятий имеет некоторые особенности. Вокруг садка или ряда садков, а иногда и под ними на период обработки подводят брезентовый или полиэтиленовый экран. Маточный раствор препарата равномерно распределяют по всему объему садка и подключают аэрацию. После обработки экран убирают.

В садки лечебные препараты можно вносить и в сухом виде, когда рассчитанное количество препарата помещают в холщовые мешочки, специальные емкости с перфорированными стенками или в пакеты, изготовленные из пористых нетканых материалов, диализной пленки, которые развешивают в разных участках садка. Вымывание препарата происходит за 3-4 дня. Обработки по мере необходимости повторяют.

При оборотной системе водообмена, то есть в установках замкнутого водообмена (УЗВ), лечебный раствор из таких препаратов как формалин, малахитовый зеленый и бриллиантовый зеленый, хлорная известь после кратковременной обработки рыбы максимально сбрасывается в канализационную сеть, то есть исключается из оборота. Другие же препараты, например фиолетовый «К», не оказывающие отрицательного влияния на биофильтр, могут быть допущены в циркуляцию и использоваться для длительной обработки рыбы из расчета создания рабочей концентрации во всем объеме циркулируемой воды, включая блок биологической очистки и отстойник.

2. Введение лекарственных препаратов с кормом применяется чаще всего при кишечных гельминтозах и бактериальных заболеваниях (приложение 16). Используют следующие способы дозирования лечебных препаратов в комбикормах: в граммах на 1 кг комбикорма или в миллиграммах на 1 кг массы рыбы. Для лучшего поедания лечебных кормов рыбе рекомендуют устроить предварительную голодную диету (не кормят около суток, а для молоди и сеголеток пропускают вечернее кормление).

Расчет необходимого количества лечебного препарата на кг корма проводят по формуле:

$$m = K \times N \times n$$

Где : m – необходимое количество препарата, (кг или г);

N – суточная норма корма, кг;

K –лечебная доза препарата, г/кг корма;

n – курс кормления в днях

Если доза препарата рассчитывается на кг массы рыбы, то суточную дозу лечебного корма определяют в процентах к массе рыб по рыбоводным нормативам, которая зависит от температуры воды на момент лечения, но обычно не более 5%.

Лечебные корма задаются рыбе в соответствии с действующими инструкциями и наставлениями. При этом следует помнить, что комбикорма содержащие антибиотики исключают из рациона не менее чем за 1 месяц до реализации товарной рыбы. Использование наиболее распространенных препаратов с кормом приведено в таблице 8. При длительных курсах (10 дней и более) рыбы через 5-6 дней могут перестать брать лечебный корм. Поэтому приходится прерывать курс на 2-3 дня с заменой лечебного корма обычным.

Лечебные корма рыбам дают в тестообразном или гранулированном виде. При введении лечебного препарата в корм важно, чтобы он им пропитался. Для этого из рассчитанной дозы препарата готовят маточные растворы или суспензии, добавляют их к обычному комбикорму, тщательно перемешивают и оставляют для протравливания на 10-12 ч. Возможно опрыскивание сухих гранкормов водным или масляным раствором лечебного препарата. Однако лучше, когда гранулированные лечебные корма готовят на комбикормовых заводах по специальной технологии согласно ТУ. Так при кишечных гельминтозах – кавиозе, ботриоцефалезе и др. применяют готовый гранулированный комбикорм циприноцестин, содержащий лечебный препарат микросал, при филометроидозе – филомецид, содержащий нилверм и т.д. При инфекционных заболеваниях (аэромонозе и др.) применяют лечебные корма с антибиотиками (группа кормовых антибиотиков: кормогризин, биовит, биоветин и др.), а так же с антисептиками (метиленовым синим), препаратами нитрофуранового ряда фуразалидон, фурадонин и др.) и сульфаниламидами (сульфамеразин). Для борьбы с бактериальной геморрагической септицемии очень эффективно лечебно-профилактическое кормление рыб гранулированным кормом с пробиотиками (субтилис, субалин и т.д.).

В некоторых случаях при гельминтозах и инфекционных болезнях лечебные препараты вводят рыбам перорально (с помощью зонда). Этим способом в основном индивидуально обрабатывают производителей и ремонтное стадо рыб. Для этой цели применяют тонкие резиновые или пластиковые катетеры (зонд). Зонд вводят в передний отдел кишечника, лечебный препарат дозируют на крахмальном клейстере. Например, производителям и ремонтной группе карпов биомицин и левомецетин против аэромоноза из расчета 50 мг/кг массы рыб вводят в составе 3 %-ной крахмальной суспензии.

Пример расчет. Задание.

Рассчитать необходимое количество субалина для профилактики аэромоноза карпа в нагульном пруду площадью 75 га, если плотность посадки рыбы 7 тыс. шт./га.

Суточная доза корма 3% от веса рыбы. Навеска рыбы 120 г.

Расчет:

Выясняем по таблице (Приложение 16), что лечебный курс 5 дней, доза субалина 0,008 г/кг корма.

1. Определяем количество рыбы в пруду:

$$7 \text{ тыс. шт./га} \times 75 \text{ га} = 525 \text{ тыс. шт.}$$

2. Определяем вес всей рыбы в пруду

$$120 \text{ г} \times 525 \text{ тыс. шт.} = 63000 \text{ кг} = 63 \text{ т.}$$

3. Определяем суточную потребность в корме:

$$63 \text{ т} \times 3\% : 100 = 1,89 \text{ т} \approx 2 \text{ т}$$

4. Определяем необходимое количество субалина на 1 день.

$$0,008 \text{ г/кг} \times 2000 \text{ кг} = 16 \text{ г}$$

5. Определяем необходимое количество субалина на курс кормления.

$$16 \text{ г} \times 5 \text{ дн.} = 90 \text{ г}$$

3. Инъекционный метод введения. В ряде случаев эффективным методом введения лекарств является внутрив брюшные или внутримышечные инъекции, которые рекомендуются в основном для лечения рыб ремонтно-маточного стада. Внутривбрюшинные инъекции чаще применяют для введения антибиотиков. Вначале

рассчитывают количество препарата на партию рыб, готовят соответствующее разведение, тщательно перемешивают. Во время бонитировки карпа для профилактики аэромоноза путем инъекции вводят левомицетин, дибиомицин и др. Антибиотики применяют в виде растворов, суспензий на дистиллированной или кипяченой водопроводной воде, а также с добавлением пролонгаторов (экмолина, вазелинового масла и др.). Все лечебные мероприятия должны проводиться согласно действующим инструкциям. Внутримышечно (в область спины) инъецируют производителей в преднерестовый период аминокислотными смесями и витаминами группы В вместе с раствором гипофиза. Более подробно о расчете доз препаратов, необходимых для введения рыбе изложено в лабораторной работе №35, аналогично тому, как вводят вакцинные препараты.

Ход работы

5. Составить план оздоровительных мероприятий в случае возникновения какого-то карантинного заболевания в виртуальном рыбоводном хозяйстве (по заданию преподавателя).
6. Ознакомиться со способами применения лечебных препаратов в хозяйствах различного типа.
7. Освоить методику расчета необходимого количества лекарственных препаратов при различных способах их применения.
8. Используя обучающую компьютерную программу, провести расчет потребности в препаратах при их внесении в воду и в корм, исходя из п.1 или по заданию, вынесенному в Приложение 17 и 18.

Контрольные вопросы:

8. Что понимают под термином «терапия»?
9. При каких заболеваниях рыб на рыбоводное хозяйство накладывают карантин?
10. Каков порядок наложения и снятия карантина на рыбоводное хозяйство?
11. Какие препараты используются в аквакультуре для лечения рыбы в прудах?
12. Какие лечебные препараты задают рыбе с кормом?
13. Как проводится лечебная обработка рыбы в лотках и бассейнах?
14. Как проводится лечебная обработка рыбы в садках?
15. Как проводится лечебная обработка рыбы в установках с замкнутым водообеспечением?
16. Какие данные необходимы для расчета дозы лечебного препарата при обработке рыбы в прудах?
17. Какие данные необходимы для расчета дозы лечебного препарата при проведении лечебного кормления?

Лабораторная работа № 7 «Взятие и транспортировка патологического материала при диагностике инфекционных болезней рыб.»

Цель работы:

1. Ознакомление с правилами асептического вскрытия рыбы.
2. Изучение особенностей взятия, фиксации и транспортировки патологического материала при инфекционных болезнях рыб.

Материалы и оборудование: аквариум, живая рыба, ножницы, пинцет, скальпель, препаровальные иглы, пастеровские пипетки, банка со спиртом для инструментов, сосуд с дезинфицирующей жидкостью (3-5%-ным раствором хлорамина или карболовой кислоты), 70⁰ спирт для протирания рук, ватные тампоны или марлевые салфетки, эмалированная кювета с парафином и препаровальные иглы для фиксирования рыбы, карандаш или маркер по стеклу, газовая горелка или спиртовка, консервирующий раствор.

Задание:

1. Изучить правила асептического вскрытия рыбы, взятия, фиксации и транспортировки патологического материала.
2. Провести стерильное вскрытие рыбы с последующим отбором патологического материала.

Теоретическая часть

Правильная диагностика инфекционных заболеваний рыб зависит от времени проведения и качества лабораторных исследований. Патологический материал на вирусологические, бактериологические и микологические исследования отбирают от живой рыбы с соблюдением правил асептики в стерильную посуду, на стерильные плотные питательные среды или консервирующие жидкости и жидкие питательные среды. При этом используют стерильные инструменты, которые регулярно фламбируют в пламени горелки,

Перед вскрытием рыбу обездвиживают, куском ваты или марли удаляют с поверхности тела избыток влаги и, поместив на бумажное полотенце, салфетку или лист фильтровальной бумаги, отрезают плавники и снимают чешую на левой стороне тела. Срезают жаберную крышку и вырезают жабры, ножницами вскрывают череп и извлекают мозг. Осторожно, чтобы не повредить кишечник, тремя разрезами (от основания левого грудного плавника вверх к боковой линии, затем - вдоль средней линии тела к анальному отверстию и из достигнутой точки - вверх и вперед вдоль боковой линии) вскрывают полость тела и, удалив вырезанный лоскут боковой стенки, отбирают пробы внутренних органов.

Отбор рыбы на вирусологическое исследование.

Цели отбора рыб на вирусологические исследования различаются в зависимости от формы течения инфекции: открытая (заболевание) или скрытая (вирусоносительство).

При *открытом* течении вирусной инфекции исследованию подвергают больных рыб с целью постановки диагноза. При вспышке болезни в хозяйстве отбор проб проводят в начальный период или в разгар заболевания, когда вероятность выделения вируса наиболее высока. Если клинические, патологоанатомические и эпизоотологические данные позволяют подозревать конкретную вирусную болезнь, на исследование берут не менее 10 живых рыб с выраженными признаками заболевания.

В случае, если комплекс вышеуказанных данных не укладывается в рамки какой-либо из известных вирусных болезней, выборку увеличивают вплоть до объемов, рекомендуемых для детектирования вирусоносительства

О *скрытом* течении инфекции не всегда можно говорить с абсолютной уверенностью и обычно исходят из допущения, что вирусоносительство в обследуемой популяции рыб может иметь место с охватом определенной (обычно незначительной) ее части. В этом случае (при отсутствии заболевания) исследуют клинически здоровых рыб, а объем выборки варьирует в зависимости от предполагаемого уровня вирусоносительства. Целью же исследования в таких случаях является оценка благополучия популяции (рыбоводного хозяйства) по вирусным инфекциям.

Исследование рыбы на вирусоносительство проводят для снятия карантина, при сертификации (паспортизации) хозяйства, для оценки эпизоотической ситуации по вирусным инфекциям.

Материал для исследования отбирают от рыб тех возрастных категорий, которые составляют группы риска, основываясь на эпизоотологических данных для каждой предполагаемой инфекции. Работу выполняют в те сезоны года, когда вероятность обострения инфекции и обнаружения вируса максимальна. Для большинства вирусных инфекций это весна, начало лета и в меньшей степени осень.

Сбор материала от *производителей* для детектирования вирусоносителей проводят во время нерестовой кампании. При возможности в первую очередь отбирают тканевой

материал от забитых рыб, подвергая их вскрытию. Остаток проб для укомплектования требуемого объема выборки добирают от рыб прижизненно в виде овариальной жидкости. Семенную жидкость от самцов берут только при недостатке самок. Объем пробы половых продуктов от одной рыбы не более 1 мл.

Для отбора порцию **икры** сцеживают в стерильную пробирку и после оседания икринок овариальную жидкость отсаживают в стерильный пенициллиновый флакон. Более аккуратно, не загрязнив пробу экскрементами или кровью, половые продукты можно отобрать с помощью автоматической пипетки с наконечником на 1-2 мл. Для этого стерильный наконечник осторожно вводят в уrogenитальное отверстие предварительно наркотизированной рыбы под небольшим давлением и, манипулируя пипеткой, отбирают необходимое количество жидкости.

Периодичность и особенности отбора материала от рыб для исследования на вирусоносительство зависят от целей работы, но в любом случае в первый год обследования материал отбирают дважды.

Отбор материала из популяции рыб осуществляют по лотам (партиям).

Лот или *партия* рыб – это группа рыб в популяции, имеющих одинаковое происхождение (получены от производителей одного маточного стада) и общий источник водоснабжения. Содержащиеся вместе рыбы одного вида, но разного происхождения составляют один лот. При обследовании рыбоводного хозяйства на предмет вирусоносительства пробы материала отбирают от рыб всех лотов.

Объем выборки рыб, отбираемых на исследование из каждого лота, зависит от размера лота и предполагаемого уровня вирусоносительства в нем (таблица 3).

Таблица 3. Необходимый объем выборки рыб при исследовании на вирусоносительство.

Размер лота, экз.	Объем выборки, необходимой для исследования, экз.	
	Уровень вирусоносительства 2%	Уровень вирусоносительства 5%
50	48	34
100	77	44
250	112	52
500	128	55
1000	138	57
1500	142	57
2000	143	58
4000	146	58
10000	147	58
100000 и более	150	60

Если в обследуемом лоте рыб встречаются ослабленные или больные особи, их отбирают на исследование в первую очередь, а недостающее количество добирают клинически здоровыми рыбами. Материал от таких рыб в дальнейшем обрабатывают и исследуют отдельно от материала, отобранного от клинически здоровых рыб.

В случае если рыбы лота содержатся в разных прудах (бассейнах, садках и т.д.), общий объем выборки остается неизменным, но она формируется на репрезентативной основе из рыб, отловленных во всех прудах (бассейнах, садках) в соответствующих пропорциях. Если обеспечение данного условия сопряжено со значительными техническими трудностями (например, в хозяйствах с большим количеством прудов), выборку комплектуют, отбирая рыбу из 1-2 прудов, в которых физиологическое состояние рыб наименее удовлетворительное.

Отловленная для исследования рыба может быть доставлена в лабораторию живой или в охлажденном виде (на льду), либо патологический материал от рыб отбирают непосредственно на месте.

Живую рыбу перевозят в емкостях с достаточным количеством воды, но лучше в полиэтиленовых пакетах на одну треть заполненных водой и на две трети - кислородом. Ихтиомасса не должна превышать одной третьей части массы воды в пакете. В теплое время года пакет помещается в термоизолирующий контейнер (пенопластовая коробка) и обкладывается льдом или пакетами замороженного бытового хладагента. Такой способ перевозки пригоден, если время транспортировки не превышает 12 час.

В охлажденном виде рыбу перевозят в термосе или пенопластовом контейнере со льдом (0 °С). При этом больную и здоровую рыбу помещают в отдельные полиэтиленовые пакеты и перекладывают их льдом (зимой снегом). В процессе транспортировки при необходимости добавляют свежий лед (снег). Таким же способом в стерильных, закрытых резиновыми пробками пенициллиновых флаконах можно транспортировать взятые от рыб на месте пробы органов и тканей (почка, селезенка, мозг, жабры, половые продукты). Время транспортировки охлажденного материала не должно превышать 24 час. В целях лучшего сохранения вирусов замораживание материала недопустимо.

Наиболее надежным способом транспортировки является транспортировка материала в питательных средах или солевых сбалансированных растворах. При этом пробы органов и тканей отбирают от рыб непосредственно в хозяйстве и помещают в стерильные флаконы с раствором Хенкса (раствором Эрла) или средой для культивирования клеток (среды Игла основная, Игла МЕМ, 199 и др.), содержащими 10% сыворотки крови эмбрионов коров и антибиотики пенициллин и стрептомицин в концентрации 300-1000 ЕД/мл (мкг/мл соответственно). Для поддержания рН в нейтральном диапазоне отношение объема образца к объему солевого раствора (среды) должно быть примерно 1:10-1:20. Плотно закупоренные флаконы перевозят и сохраняют до обработки в термосе со льдом или контейнере с хладагентом (0-4 °С), не допуская замораживания содержимого флаконов. Продолжительность транспортировки - не более 48 час.

Отобранный патологический материал для вирусологических исследований направляют в специализированные вирусологические лаборатории рыбохозяйственного или ветеринарного профиля. В отдельных случаях отбор и транспортировка материала может быть проведена специалистами производственных лабораторий и рыбоводных хозяйств.

Отбор рыбы на бактериологическое и микологическое исследования.

Больную рыбу доставляют в лабораторию в бидонах или эмалированных ведрах с крышкой, предварительно профламбированных спиртом и заполненных водой из того же водоема, или в полиэтиленовых пакетах, хорошо промытых и заполненных той же насыщенной кислородом водой. Температура вода не должна быть выше +10-12 °С, для чего в теплое время ее постепенно охлаждают кусочками льда. Рыб с характерными поражениями должно быть не менее 5 экземпляров.

Если рыбу нельзя доставить в лабораторию в живом состоянии, то пораженные органы и ткани помещают в стерильные, плотно закрытые пробками баночки с консервантом (1 л 0,85%-ного раствора хлорида натрия смешивают с 500 мл химически чистого (х. ч.) глицерина и прибавляют 20%-ный раствор фосфорнокислого натрия до получения рН 8,0; стерилизуют при температуре 112 °С в течение 10 мин). Кровь и экссудат запаивают в стерильные пастеровские пипетки.

Пробы с сопроводительным документом доставляют в лабораторию как можно быстрее (летом не позже чем через 2 ч после взятия проб). Если доставка проб требует более длительного времени, баночки помещают в термостат со льдом или посеvy осуществляют в рыбоводном хозяйстве.

Рабочее место готовят заранее: кювету для вскрытия рыбы, препаровальные иглы, стерилизатор с инструментами (ножницы, скальпель, пинцет), баночку со спиртом, ватные тампоны, простерилизованные в чашке Петри, ватные тампоны, смоченные в воде, предметные и шлифованные стекла, пастеровские пипетки, шпатели, смесь Никифорова, полоски фильтровальной бумаги для впитывания крови, стерильные марлевые салфетки в пакетах, баночки и консервант для отбора проб, чашки Петри с питательными средами, жидкие питательные среды с пробирках, карандаш или маркер по стеклу, журнал для регистрации.

Для правильного выбора методов выделения и культивирования возбудителя большое значение имеет сбор сведений о клинических признаках заболевания и эпизоотологических данных (вид рыбы, температура, при которой возникло заболевание, массовость заболевания, условия содержания рыбы и др.). Эти сведения, а также первичный внешний осмотр больных особей позволяют выбрать направление исследования.

1. При осмотре рыбы отмечают ее вид, возраст, размер и массу, наличие клинических признаков: изменение пигментации, гиперемии, точечные или обширные гемorragии, абсцессы, опухоли, некроз, ерошение чешуи, при наличии язв – характер язв, состояние жабр (ослизненные, разбухшие, некротизированные, бледные, темные), плавников, глаз, воспаление ануса, выделения из него, характер выделений (гнойные, слизистые, кровянистые).

2. Перед взятием рыбы руки обрабатывают 70⁰-ным спиртом. Рыбу вылавливают из ёмкости сачком, фиксируют обмытыми спиртом руками, обездвиживают и осматривают поверхность тела и наружные органы. Если на теле рыбы имеются **язвы**, их промывают вначале стерильным физиологическим раствором или стерильной водой, затем берут соскоб, захватывая по возможности и пораженные ткани.

3. При наличии **опухолей, абсцессов, фурункулов** с них снимают чешую (если она есть), прижигают участок кожи ватным тампоном, смоченным спиртом, или раскаленным шпателем и через струп проникают в глубину опухоли и насасывают содержимое, затем засевают на чашки с питательными средами или переносят в консервирующие растворы.

4. Рыбу укладывают в обработанную спиртом кювету с парафином на правый бок, брюшной стороной к исследователю и фиксируют в области головы и хвоста препаровальными иглами. Левую сторону рыбы фламбируют горящим тампоном, смоченным спиртом.

5. Нагретым на пламени спиртовки скальпелем прижигают небольшой участок **кожи**, затем кожу вырезают профламбированными ножницами и помещают на поверхность стерильных питательных сред или в консервирующие растворы.

6. У рыбы профламбированными ножницами вырезают жаберную крышку, нагретым на пламени спиртовки скальпелем прижигают небольшой участок **жаберных лепестков**, их вырезают и помещают на поверхность стерильных питательных сред или в консервирующие растворы.

7. **Исследование мозга.** У мелких рыб раскаленным шпателем прижигают затылочную часть головы, обломанным концом пастеровской пипетки делают прокол и набирают мозговое вещество для исследования. У крупных рыб после прижигания шпателем предварительно делают прокол стерильным скальпелем.

8. **Исследование при наличии асцита.** В местах, где ощущается флюктуация, удаляют чешую, прижигают кожу, делают прокол острым концом пастеровской пипетки, набирают экссудат, из которого делают высеv на питательные среды и мазок на предметном стекле.

9. **Проведение вскрытия рыбы.** Стерильным скальпелем прокалывают брюшную стенку несколько выше анального отверстия, не повреждая при этом кишечник. В разрез вводят тупой конец ножниц и осторожно, избегая повреждений внутренних органов, рассекают брюшную стенку дугообразно вперед и вверх к позвоночнику и далее вперед и

вниз к жаберной крышке за основание грудного плавника. Стерильным пинцетом отворачивают брюшную стенку и удаляют ее разрезом по средней линии.

10. Исследование крови. Кровь можно брать из сердца, хвостовой вены или артерии.

Кровь из сердца отбирают пастеровской пипеткой. Перед взятием орган прижигают нагретым на пламени спиртовки скальпелем. Над пламенем спиртовки обламывают кончик пастеровской пипетки, прокалывают орган в прижженном месте, набирают небольшое количество материала. Первую каплю крови удаляют стерильным ватным тампоном, затем делают посевы на чашки Петри с питательными средами или пробу крови помещают в консервирующий раствор.

11. Исследование содержимого желчного пузыря. Желчь берут пастеровской пипеткой после прижигания стенки. Над пламенем спиртовки обламывают кончик пастеровской пипетки, прокалывают орган в прижженном месте, набирают небольшое количество материала и переносят на поверхность стерильного питательного агара в чашку Петри или в консервирующий раствор. Если желчный пузырь очень мал, его обрабатывают спиртом, отсекают стерильными ножницами, кладут на поверхность питательной среды, вскрывают и делают посев содержимого или орган переносят в консервирующий раствор.

12. Исследование печени и селезенки. Участок печени и селезенки прижигают нагретым на пламени спиртовки скальпелем. Стерильными ножницами отрезают кусочек органа и помещают его на поверхность стерильных питательных сред или в консервирующие растворы.

Небольшие органы берут полностью, быстро проводя сквозь пламя спиртовки, и над чашкой Петри рассекают стерильным скальпелем. Кусочком, оставшимся на пинцете, делают мазки-отпечатки для прямой микроскопии.

13. Исследование содержимого нижнего отдела кишечника. Конец пастеровской пипетки надламывают, причем острые края оплавливают на огне, чтобы не повредить стенку кишечника, и вводят в задний отдел кишечника. Содержимое кишечника засевают на чашки с питательными средами или в консервирующие растворы.

14. Исследование почек. Участок почек прижигают нагретым на пламени спиртовки скальпелем или раскаленной пастеровской пипеткой. Острым концом другой пастеровской пипетки делают прокол и разрыхляют паренхиму. Содержимое из пипетки переносят на чашки с питательными средами или консервирующие растворы.

Ход работы:

1. Освоить метод стерильного вскрытия рыбы.
2. Отобрать пробы патологического материала для диагностики инфекционных болезней рыб.
3. ЗВьявить патологические изменения у рыбы и записать в рабочую тетрадь.

Контрольные вопросы

1. Расскажите о правилах взятия и пересылки больной рыбы при диагностике инфекционных заболеваний.
2. Как проводят консервирование патологического материала в случае, если нельзя доставить живую рыбу в ихтиопатологическую лабораторию?
3. Какие признаки следует учитывать при внешнем осмотре рыбы?
4. Как отбирают патологический материал при наличии у рыбы опухолей, абсцессов, язвенных поражений, асцита?
5. Расскажите о технике отбора проб органов и тканей рыб при диагностике вирусных, бактериальных и микозных заболеваний.

Лабораторная работа № 8 «Жгутиконосцы, паразитирующие у рыб»

Цель работы:

1. Изучение морфологических особенностей строения жгутиконосцев, их систематическое положение.
2. Освоение навыков определения жгутиконосцев.
3. Ознакомление с методами приготовления временных микропрепаратов.

Материалы и оборудование: рыба живая или охлажденная, кюветы для вскрытия рыбы, вода дистиллированная, скальпели, пинцеты, ножницы, глазные пипетки, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, микроскопы, лабораторная коллекция микропрепаратов жгутиконосцев, лабораторная коллекция микропрепаратов жгутиконосцев, определители паразитов рыб.

Задание:

1. Изучить морфологические и биологические особенности жгутиконосцев.
2. Освоить навыки определения жгутиконосцев, используя постоянные препараты.
4. Зарисовать жгутиконосцев в рабочую тетрадь, отметив особенности их строения.
5. Освоить метод выделения и приготовления временных микропрепаратов из жгутиконосцев.

Теоретическая часть

Из типа жгутиконосцев – *Sarcomastigophora* у рыб паразитируют представители отрядов *Diplomonadida* и *Kinetoplastida*.

Представители отряда *Diplomonadida* - жгутиконосцы с двойным симметричным набором органелл: 2 ядра, 8 жгутиков и т.д. В рыбах водоемов России паразитирует один род *Hexamita* и один вид - *H. truttae* (рис. 17).

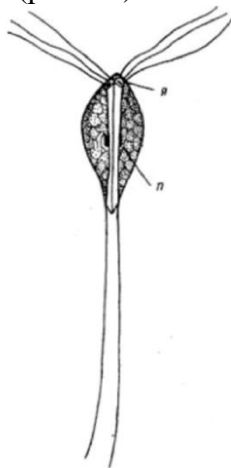


Рисунок . 17 - *Hexamita truttae*: я – ядро, п – парабазальное тело.

Локализуется в кишечнике и желчном пузыре лососевых рыб. Мелкий паразит овальной формы, размером 7-14x3-10 мкм. Имеет четыре пары жгутиков, при помощи которых передвигается: три пары расположены на переднем конце тела и одна пара на заднем. Возле переднего конца находится два продолговатых ядра. В жгутиковой стадии паразит размножается простым делением в клетках эпителия кишечника. Жгутиконосец способен образовывать цисты, которые могут существовать некоторое время вне организма хозяина.

Болезнь может проявляться в острой и хронической формах, широко распространена в форелевых хозяйствах и лососевых заводах. У больных рыб отмечается

гиперемия слизистой кишечника, особенно в передней части. Желчный пузырь наполнен красноватым содержимым. Из ануса выделяются слизеобразные тяжи белого цвета.

Представители отряда кинетопластыды (Kinetoplastida) – мелкие бесцветные жгутиконосцы, имеющие от 1 до 2-4 жгутиков, связанных с кинетопластом – особым органоидом митохондральной природы, содержащим большое количество ДНК.

Жгутиконосец *Ichtiobodo necator* (*Costia necatrix*) относится к сем. Bodonidae, отр. Kinetoplastida (рис. 18).

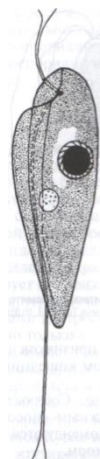


Рисунок . 18 - Возбудитель ихтиободоза *Ichtiobodo necator*.

Имеет характерную форму тела с двумя жгутиками, направленными назад. Паразиты жабр и кожи рыб. Вызывают серьезные заболевания молоди. По бокам тела молоди рыб образуются сначала пятна, а затем сплошной сероватый налет. Часто наблюдается разрушение плавников. Пораженные жаберы приобретают бледную окраску и покрываются слизью.

К этому же отряду и семейству относится род *Trypanosoma*. Представители этого рода имеют удлинненное тело, заостренное на обоих концах. Базальное тельце и кинетопласт находится на заднем конце клетки. Жгутик, направленный вперед, прирастает по всей длине клетки, образуя ундулирующую мембрану, которая на переднем конце переходит в свободно свисающий жгутик. Имеется одно крупное ядро в центре клетки (рис. 19).

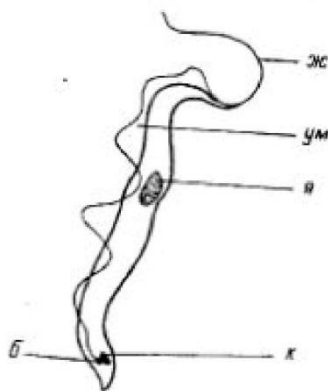


Рис. 19 – Схема строения *Trypanosoma*

ж – свободная часть жгутика, ум – ундулирующая мембрана, я – ядро, к – кинетопласт, б – базальное тельце.

У рыб трипаносомы паразитируют в крови (рис. 20), вызывают анемию, отеки, которые хорошо видны в подкожной клетчатке и на респираторном эпителии жабр. Размножаются со сменой хозяев. Основным хозяином, в организме которого проходит большая часть жизненного цикла, служат кровососущие пиявки.

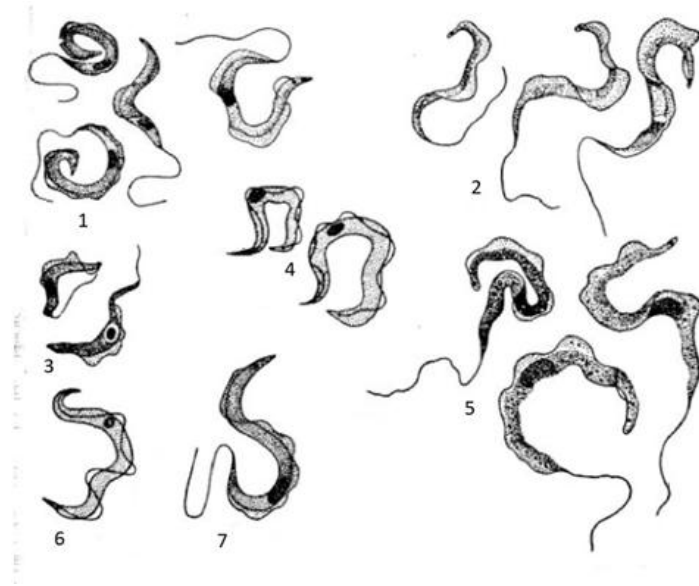


Рисунок 20 – Виды трипаносом из крови рыб:
 1 - *Trypanosoma schulmani*; 2 – *T. liocassis*; 3 – *T. bliccae*; 4 – *T. sarcochilichthys*; 5 – *T. sinipercae*; 6 – *T. pseudobagri*; 7 – *T. carassii*.

Жгутиконосцы рода *Cryptobia* паразитируют на поверхности жабр и в кровяном русле рыб (рис. 21).

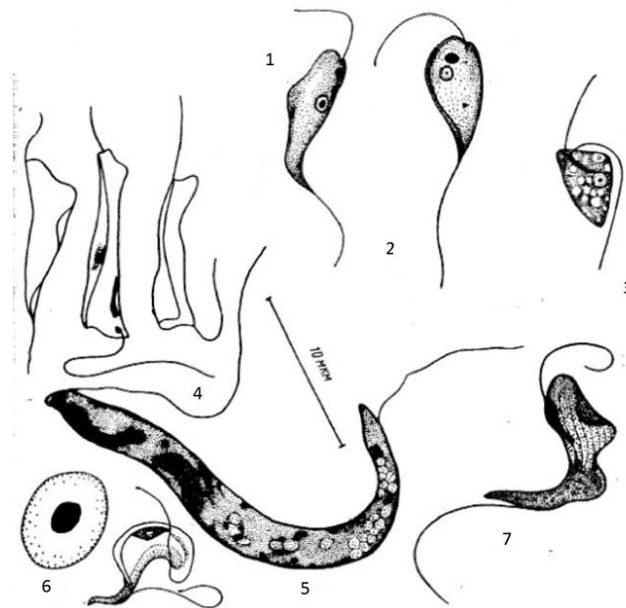


Рисунок 21 – Криптобии рыб:
 1 – *Cryptobia dahlia*; 2 – *C. branchialis*; 3 - *C. agitata*; 4 - *C. pseudoscaphirhynchi*; 5 - *C. salmositica*; 6 - *C. minuta*; 7 - *C. cyprini*.

Для криптобий известны 2 типа жизненных циклов: прямой (без промежуточного хозяина) и сложный (с участием пиявок).

C. branchialis, паразитирующие на жабрах, вызывают их ненормально яркую красную окраску. Паразиты разрушают жаберные лепестки, затрудняя дыхание рыб. Кожные покровы сильно ослизнены. Больные рыбы отказываются от корма. *C. cyprini* – мелкие бесцветные жгутиконосцы с неясно выраженным ядром. Сильное заражение приводит к истощению рыбы, которая слабо реагирует на раздражение. Иногда наблюдается гиперемия кожных покровов и образование подкожных пузырей с розоватым экссудатом.

C. salmositica имеет характерные морфологические признаки криптобий). Её развитие происходит с участием пиявок, в которых жгутиконосцы размножаются бесполом путем. В дальнейшем они проникают во влагиалище хоботка пиявки. При укусе пиявки паразиты попадают в кровь рыбы. Для этого вида описан также прямой жизненный цикл, т.е. паразит передаётся от рыбы к рыбе через воду без пиявки. В России паразиты выявлены в бассейне реки Терек у каспийского лосося и его пресноводной формы – ручьевой форели.

Криптобиоз каспийского лосося протекает у молоди в возрасте от одного года и старше. Рыбы старше двух лет являются паразитоносителями. Больная рыба держится в толще воды, слабо реагирует на человека, не питается и гибнет. При невысоком заражении годовики плохо питаются и отстают в росте. Зараженная рыба очень чувствительна к уменьшению содержания в воде кислорода. При сильной инвазии у больных рыб возникают водянка, экзофтальмия, ярко выраженная анемия жабр и внутренних органов. Кровь бледно-розового цвета, плохо свертывается. В полости тела и в сердечной сумке скапливается прозрачный розоватый экссудат.

1. Сбор материала.

Живую рыбу обездвиживают и кладут в кювету. Можно использовать охлажденную рыбу. Делают соскобы с поверхности тела, ротовой полости, носовых ямок (лабораторная работа № 19). Помещают их на отдельные покровные стекла, добавляя 1-2 капли воды. Готовят мазок крови, как указано в лабораторной работе № 4. мазок подсушивают, накрыв чашкой Петри. Каплю крови помещают на предметное стекло и накрывают покровным стеклом. Выделяют жаберные дуги, делают соскоб на стекле для вскрытия и добавляют несколько капель воды. Вскрывают рыбу с соблюдением требований, изложенных в лабораторной работе № 19. Извлекают желчный и мочевой пузыри, вскрывают их и содержимое помещают на предметное стекло. Затем вскрывают кишечник, делают клятч-препараты и соскобы с внутренней стенки кишечника. Соскобы помещают на предметное стекло, добавляют 1-2 капли воды. Пипеткой берут каплю жидкости из брюшной полости, помещают на предметное стекло и накрывают покровным стеклом. Соскобы просматривают под малым и большим увеличением микроскопа и, найдя паразитов, рассматривают их и зарисовывают.

2. Определение паразитов.

Изготовленные или готовые препараты помещают под микроскоп и изучают под масляной иммерсией. Рассматривают и зарисовывают расположение ядерного аппарата, жгутиков и других органелл. С помощью определителя выясняют видовую принадлежность жгутиконосцев. Результаты работы оформляют в тетради для лабораторных занятий.

Ход работы.

1. Ознакомиться с ходом работы и морфологическими признаками жгутиконосцев, являющимися определительными ключами.
2. Записать в тетрадь систематическое положение жгутиконосцев.
3. Изготовить временные препараты, выделенные из представленных на анализ рыб.
4. На постоянных препаратах рассмотреть, измерить и зарисовать основных представителей жгутиконосцев.
5. Пользуясь определителями паразитов рыб, провести родовую идентификацию жгутиконосцев из представленной коллекции микропрепаратов.

Контрольные вопросы

1. Расскажите о строении жгутиконосцев, паразитов рыб, способах их размножения.
2. Какие виды жгутиконосцев, паразитирующих у рыб, Вы знаете?

3. В каких органах рыб паразитируют трипаносомы, криптобии, костия, гексамита?
4. Какие патологические изменения у рыб вызывают жгутиконосцы?

Лабораторная работа № 9 «Инфузории, паразитирующие у рыб»

Цель работы:

1. Изучение морфологических особенностей паразитических инфузорий, их систематического положения.
2. Освоение навыков определения различных инфузорий.
3. Ознакомление с методами приготовления временных микропрепаратов.

Материалы и оборудование: живая рыба, кюветы для вскрытия рыбы, вода дистиллированная, скальпели, пинцеты, глазные пипетки, предметные и покровные стекла, микроскопы, лабораторная коллекция микропрепаратов инфузорий, определители паразитов рыб.

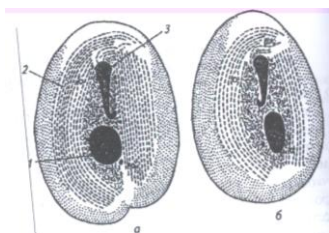
Задание:

1. Приготовить мазки с покровов живой рыбы и изучить их под микроскопом.
2. Рассмотреть строение найденных инфузорий на мазках и микропрепаратах.
3. Освоить навыки определения инфузорий, используя постоянные препараты.
4. Научиться определять найденных на препарате инфузорий до рода.
5. Зарисовать найденных инфузорий в рабочей тетради.

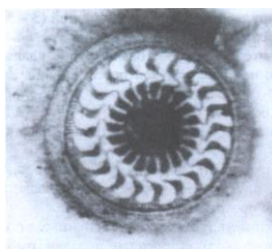
Теоретическая часть

Из типа ресничных инфузорий (Ciliophora) у рыб паразитируют представители 6 классов: Pleurostomata, Cyrtostomata, Rimostomata, Hymenostomata, Peritricha, Suctorina. Тип ресничных – Ciliophora наиболее сложно устроенная группа среди простейших. Размеры их колеблются от 20 до 80 мкм, и только ихтиофтириус достигает 1-2 мм в диаметре. Они имеют постоянную форму тела, благодаря наличию оболочки (рис. 22). Органоидами движения служат многочисленные реснички, которые покрывают тело клетки целиком или частично. Реснички расположены рядами – кинетами. У большинства инфузорий есть постоянное ротовое отверстие – цитостом, располагающийся в особом углублении – перистоме. Вокруг цитостома имеется система околоротовых кинет (рядов ресничек) или их производных – мембранелл и мембран. Ротовое отверстие ведет в клеточную глотку (цитофаринкс), которая у некоторых инфузорий (например: хилодонелл) снабжена особым палочковым аппаратом, способным выворачиваться наружу. На дне глотки по мере поступления пищи образуется пищеварительная вакуоль. Непереваренные остатки пищи выбрасываются через постоянное отверстие – порошицу.

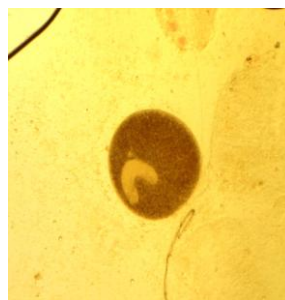
У сосущих инфузорий питание осуществляется с помощью щупальцевого аппарата. В эндоплазме инфузорий находятся 2 (иногда больше) ядра. Одно крупное, ведающее соматическими процессами – макронуклеус, и второе генеративное - микронуклеус. Размножение инфузорий происходит на теле рыбы, реже в воде делением пополам или многократно повторяющимся делением надвое (палинтомия). У некоторых инфузорий наблюдается половой процесс (конъюгация). При неблагоприятных условиях многие инфузории образуют цисты покоя, некоторые длительное время могут сохраняться в водоеме. Некоторые инфузории образуют цисты в период размножения или перестройки ядерного аппарата. Инфузории паразитируют у рыб на поверхности тела, в жабрах, носовых ямках, ротовой полости, мочевом пузыре и очень редко в пищеварительном тракте.



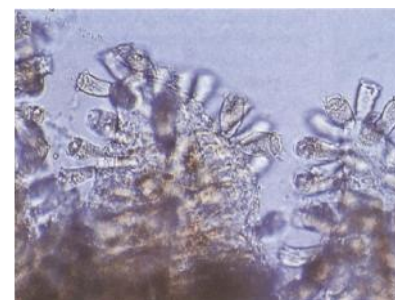
а – *Chilodonella piscicola*;
 б – *Ch. hexasticha*;
 1 – ядро; 2 – ряды ресничек;
 3 – ротовой аппарат.



Trichodina sp/



Ichthyophthirius multifiliis



Сидячие инфузории

Рисунок 22 – Инфузории, паразитирующие у рыб

Инфузории *Chilodonella piscicola* и *Ch. hexasticha* имеют важное эпизоотическое значение и нередко вызывают большие отходы сеголетков карпа в рыбоводных хозяйствах (рис. 6, а, б). Паразит питается за счет клеток эпителия. Размножается прямым делением в поперечном направлении. Заболевание чаще поражает ослабленную рыбу. Встречается у очень многих пресноводных рыб, как у молодежи, так и у взрослых, во все сезоны года.

При серьезной форме заболевания у рыб на поверхности тела появляется голубовато-серый налет, связанный с раздражением кожи рыбы паразитом, и сопровождающимся усиленным слизеотделением. Патогенное воздействие паразита проявляется в нарушении дыхательных функций поверхности тела и жабр вследствие сильного повреждения их паразитом.

Ихтиофтириоз – заболевание многих пресноводных рыб, широко распространен в рыбоводных хозяйствах различного типа. Часто вызывает массовую гибель рыб. Возбудитель - *Ichthyophthirius multifiliis* (сем. Ichthyophthiriidae, отр. Hymenostomatida) (рис. 6, б), тело паразита округлое, на поверхности располагаются ряды ресничек. Имеется крупный подковообразный макронуклеус и небольшой микронуклеус, а также сократительные вакуоли. Паразит обитает под эпителием кожи и жабр хозяина.

Размножение происходит вне тела хозяина. Зрелые паразиты (трофонты), разрывая эпителиальный бугорок, выходят в воду (рис. 23). Опустившись на дно, они приклеиваются к различным подводным предметам. Вокруг паразита образуется нежная студенистая циста, внутри которой происходит многократное деление паразита надвое. По окончании деления из трофонта образуется большое количество дочерних клеток, называемых бродяжками. При помощи фермента гиалуронидазы бродяжки растворяют стенку цисты и выходят в воду, плаывая с помощью ресничек. Попав на рыбу, бродяжки внедряются под эпителий, где растут и созревают. Бродяжки, не нашедшие хозяина, погибают.

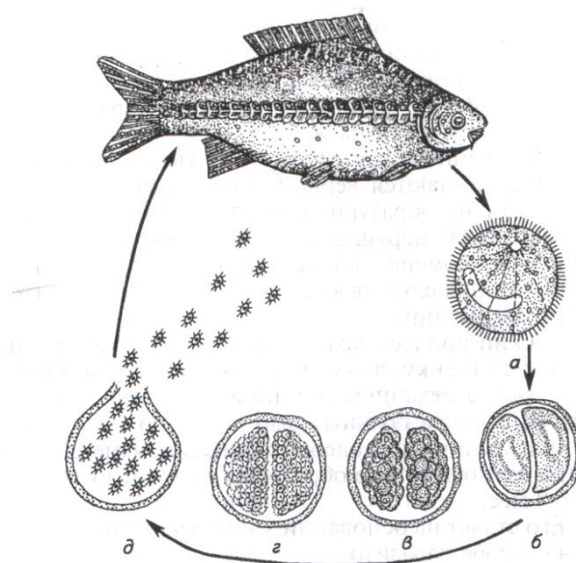


Рисунок . 23 - Цикл развития *Ichthyophthirius multifiliis*:
a – зрелый трофонт; **б, в, г** – деление паразита; **д** – выход бродяжек.

При заражении рыбы крупные паразиты хорошо видны в виде небольших белых бугорков. В случае сильного заражения с больной рыбы сходит эпителий, рыбы задыхаются, идут к притоку и гибнут. Патологический процесс захватывает внутренние органы, особенно печень и селезенку, что свидетельствует о значительном токсическом воздействии паразита. У переболевших рыб вырабатывается постинвазионный иммунитет.

Инфузории из семейства Trichodinidae (класс Oligohymenophora, подкласс Peritricha), паразитирующие у рыб, относятся к нескольким родам: Trichodina, Tripartiella, Trichodinella, Paratrachodina, Dipartiella (рис. 23). Заболевания, вызываемые этими инфузориями, называются триходиниозами. Инфузории чаще локализуются на коже и жабрах рыб, реже встречаются во внутренних органах (мочевой пузырь, мочеточники) и не обладают строгой специфичностью, однако имеется некоторая приуроченность определённых видов инфузорий к конкретным хозяевам. Тело инфузорий блюдцеобразной формы, с расположенным внутри округлым опорным диском, состоящим из кольца хитиноидных крючьев различной величины и формы. Макронуклеус подковообразный, микронуклеус – округлый. Форма и размеры крючьев, макронуклеуса и микронуклеуса и их взаимное расположение – важные систематические признаки. Тело окружено венчиком ресничек, с помощью которых инфузории передвигаются по рыбе и плавают в воде. Размножаются простым делением.

Триходин по отношению к температуре можно разделить на теплолюбивых, холодолюбивых и эвритермных. К триходиниозам восприимчивы разные виды и разные возрастные группы рыб. Наиболее подвержены заболеванию рыбы младших возрастных групп, выращиваемых на рыбоводных заводах.

Тело зараженных рыб покрывается беловатой слизью, в тяжелых случаях слизь отделяется клочьями. Сильно зараженные рыбы подходят к притоку. Триходины разрушают эпителиальные клетки кожи и жабр хозяина, затрудняют газообмен и нарушают дыхательную функцию.

Сидячие инфузории из отряда Peritrichida родов Apiosoma, Ambiphrya, Scyphidia, Epistylis поражают молодь рыб в рыбоводных хозяйствах. Тело сидячих инфузорий обычно имеет форму бокала или конуса, на верхнем конце расположено ротовое отверстие – перистом, окруженное венчиком ресничек. На нижнем конце имеется

подошва, которой инфузория прикрепляется к хозяину. Ядерный аппарат состоит из макронуклеуса и микронуклеуса. Форма и расположение ядер, размеры, форма тела – важные систематические признаки. Размножаются эти инфузории простым делением.

Сильно зараженная рыба покрывается белым налетом, иногда наблюдается покраснение кожного покрова, слизиотделение увеличивается. Больная рыба беспокойна. Отмечается слабое ерошение чешуи. Прикрепляясь к хозяину подошвой, инфузории разрушают клетки эпителия, нарушая кожное дыхание. Мальки сильно истощаются и отстают в росте.

Из других инфузорий эпизоотическое значение имеют инфузории *Balantidium ctenopharyngodoni* из отряда Trichostomatida (рис. 24), паразитирующий в кишечнике белого амура, и *Capriniana piscium* (рис. 25), паразитирующая на жабрах сиговых, лососевых, сомов и некоторых других рыб.

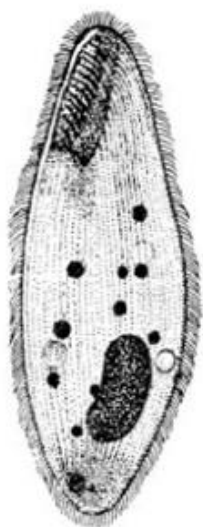


Рисунок 24 – Трофонт *Balantidium ctenopharyngodoni*

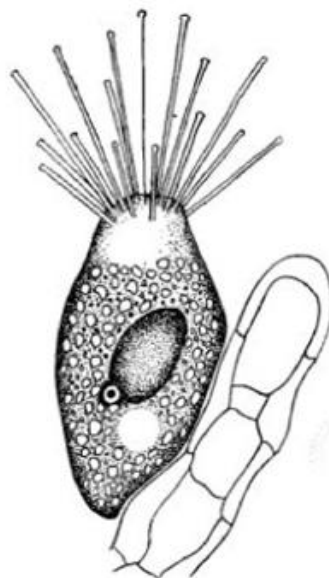


Рисунок 25 – Трофонт *Capriniana piscium* на жаберном лепестке

1. Сбор инфузорий, приготовление временных и постоянных препаратов

Для обнаружения инфузорий готовят временные препараты. Живую рыбу обездвиживают и помещают в кювету. Для изучения живых инфузорий делают соскобы с поверхности тела и просматривают под малым и большим увеличением микроскопа. На отдельных стеклах делают препараты соскобов со стенок ротовой полости, обонятельных ямок и жабр. При обнаружении паразитов просчитывают количество каждого рода инфузорий в 25 полях зрения микроскопа. Данные подсчета записывают в тетрадь.

Постоянные препараты готовят следующим образом: делают соскобы с участков тела, где обнаружены инфузории, высушивают их и окрашивают азотнокислым серебром.

2. Определение инфузорий.

Для видовой идентификации инфузорий используют постоянные препараты. Под большим увеличением рассматривают паразита и зарисовывают их общий вид.

У хилодонелл просчитывают количество ресничных рядов в обеих системах, обращают внимание на расположение сократительных вакуолей и их количество, измеряют длину и ширину инфузории, то есть признаки являющиеся ключами для определения вида.

У триходин измеряют зубцы прикрепительного диска согласно схеме, представленной на рисунке 26.

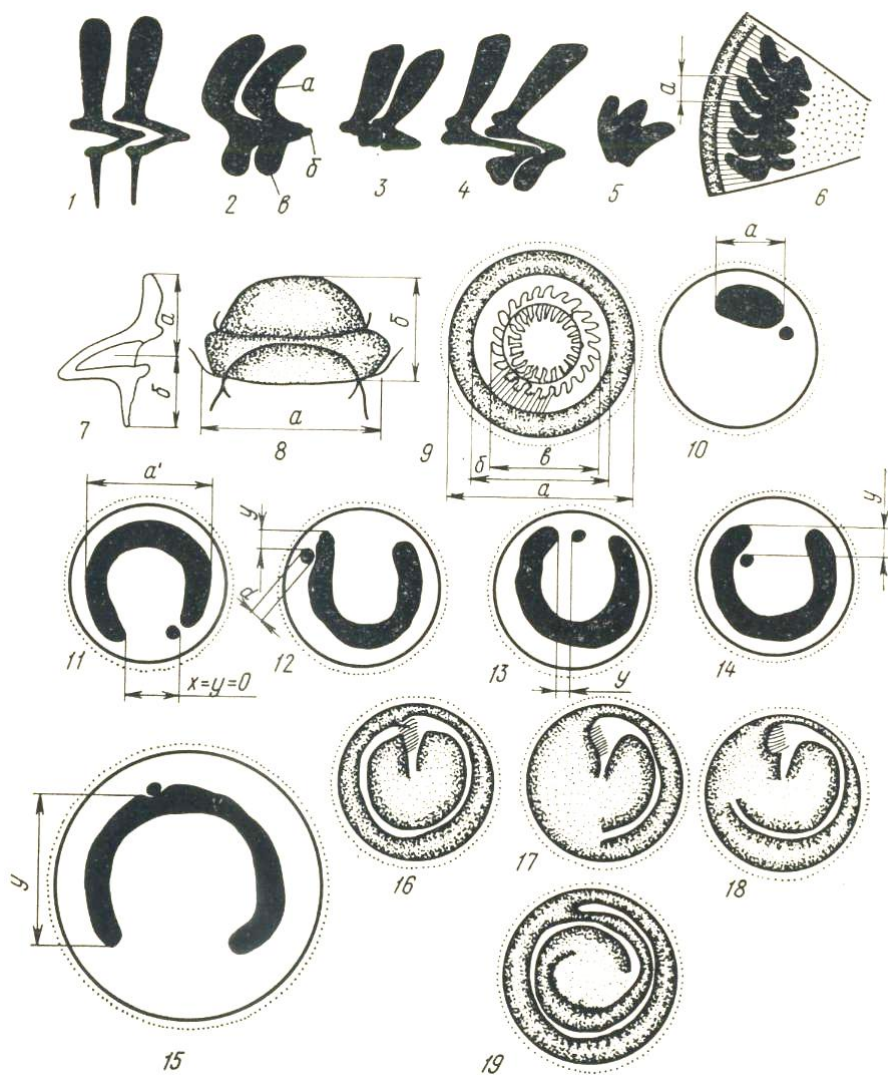


Рисунок . 26. Основные систематические признаки инфузорий сем. *Urceolariidae*
 1 – форма зубцов у *Tripartiella*; 2 – форма зубцов у *Trichodina*: а – наружный, б – внутренний отросток, в – центральная конусовидная часть; 3 – форма зубцов у *Trichodinella*; 4 – форма зубцов у *Foliella*; 5 – форма зубцов у *Dipartiella*; 6 – число полос прикрепительного диска, расположенных между двумя соседними наружными отростками (а); 7 – строение зубца; а – длина наружного, б – длина внутреннего отростка; 8 – основные измерения тела; а – диаметр тела; б – высота; 9 – основные измерения тела с аборального полюса: диаметр тела (а), прикрепительного диска-розетки (б), венчика (в)
 10-14 – форма макронуклеуса и положение микронуклеуса: а, а¹ – диаметр макро- и микронуклеуса, х – расстояние между концами макронуклеуса, у – расстояние от микронуклеуса до ближайшего конца макронуклеуса; 15-19 – типы адоральной спирали

Для определения видовой принадлежности инфузорий следует использовать «Определитель, 1984».

Ход работы

1. Сделать мазки с живой рыбы.
2. Изучить найденных на мазке и микропрепаратах инфузорий под малым и большим увеличением микроскопа.
3. Зарисовать и определить выяснять их видовую принадлежность, используя определитель.

4. Результаты работы оформить в тетради для лабораторных занятий.

Контрольные вопросы:

1. Какое систематическое положение занимают инфузории в классификации простейших?
2. Где локализуются инфузории у рыб?
3. Каких сидячих инфузорий Вы знаете?
4. Каких сосущих инфузорий Вы знаете?
5. Каковы особенности строения и размножения хилодонелл, ихтиофтириуса, триходинид?

Лабораторная работа № 10 «Кокцидии, паразитирующие у рыб»

Цель работы:

4. Изучение морфологических особенностей строения и стадий развития кокцидий, паразитирующих у рыб.
5. Освоение навыков определения кокцидий.
6. Ознакомление с методами приготовления временных микропрепаратов.

Материалы и оборудование: рыба живая, кюветы для вскрытия рыбы, вода дистиллированная, скальпели, пинцеты, ножницы, глазные пипетки, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, микроскопы, лабораторная коллекция микропрепаратов кокцидий, Определители паразитов рыб.

Задание:

1. Изучить морфологические и биологические особенности кокцидий.
2. Изучить систематику кокцидий.
3. Освоить навыки определения кокцидий, используя постоянные препараты.
4. Освоить метод выделения и приготовления временных микропрепаратов кокцидий.

Теоретическая часть

Из типа споровиков (*Apicomplexa*) у рыб паразитируют представители класса Sporozoa и двух отрядов – Eimeriida (истинные кокцидии) и Adeleida (гемогегарины).

Кокцидии - внутриклеточные паразиты в основном эпителиальной ткани кишечника, печени, почек, гонад и других органов рыб. Жизненный цикл сложный и характеризуется чередованием полового и бесполого размножения. Для полового размножения характерно заметное различие мужских и женских половых элементов (микро- и макрогамет). В результате их слияния образуется зигота, одетая плотной оболочкой, называемая ооцистой. В ооцисте формируются споры, в которых образуются спорозоиты. Кокцидии паразитируют у пресноводных и морских рыб.

У пресноводных рыб кокцидии часто вызывают заболевания: кокцидиозный энтерит карпа и толстолобиков, в морских и солоноватых водах - кокцидиоз семенников сельдевых.

Из отряда *Eimeriida*, семейства *Eimeriidae* у рыб паразитируют представители двух родов: род *Goussia* и род *Eimeria*.

Ооцисты кокцидий *Goussia carpelli* сферические, тонкостенные, без остаточного тела, диаметром 5-16 мкм. В каждой ооцисте находится по четыре овальные споры, расположенные очень тесно. Каждая спора содержит по 2 спорозоида и остаточное тело (рис. 27).

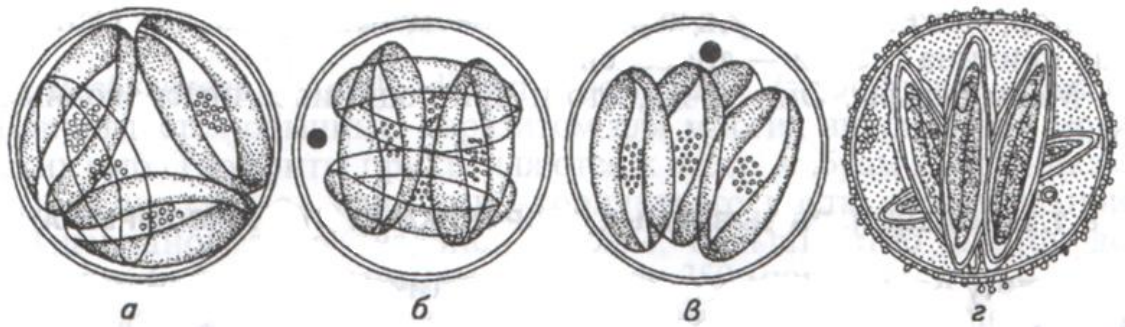


Рисунок . 27 Ооцисты кокцидий - возбудителей кокцидоза: *а* – *Goussia carpelli*, *б* – *G. sinensis*, *в* – *G. cheni*, *г* – *Eimeria sardinae*.

Весь процесс размножения происходит в организме хозяина и во внешнюю среду выделяются уже инвазионные ооцисты, которых рыбы заглатывают с пищей.

После попадания в кишечник рыбы оболочка ооцисты растворяется, спорозонты покидают споры и внедряются в стенку кишечника, превращаясь в шизонт. Он достигает определенной величины и многократно делится (процесс шизогонии). Вокруг каждого ядра образуется цитоплазма, затем шизонт распадается на множество клеток, называемых мерозонтами. Они внедряются в здоровые клетки кишечника.

Часть из них становятся шизонтами и продолжают бесполое размножение. Другие дифференцируются по полу на микро- и макрогаметы. Микрогаметы с помощью жгутиков двигаются, отыскивают макрогаметы и сливаются с ними, образуя зиготу. Зигота обрастает плотной оболочкой и превращается в ооцисту.

В ооцисте идет формирование спор, внутри которых происходит деление и образование спорозонтов. Неизрасходованная часть цитоплазмы называется остаточным телом. Зрелые ооцисты выводятся с экскрементами из организма рыбы во внешнюю среду и, попадая в организм восприимчивого хозяина, повторяют цикл развития (рис. 28).

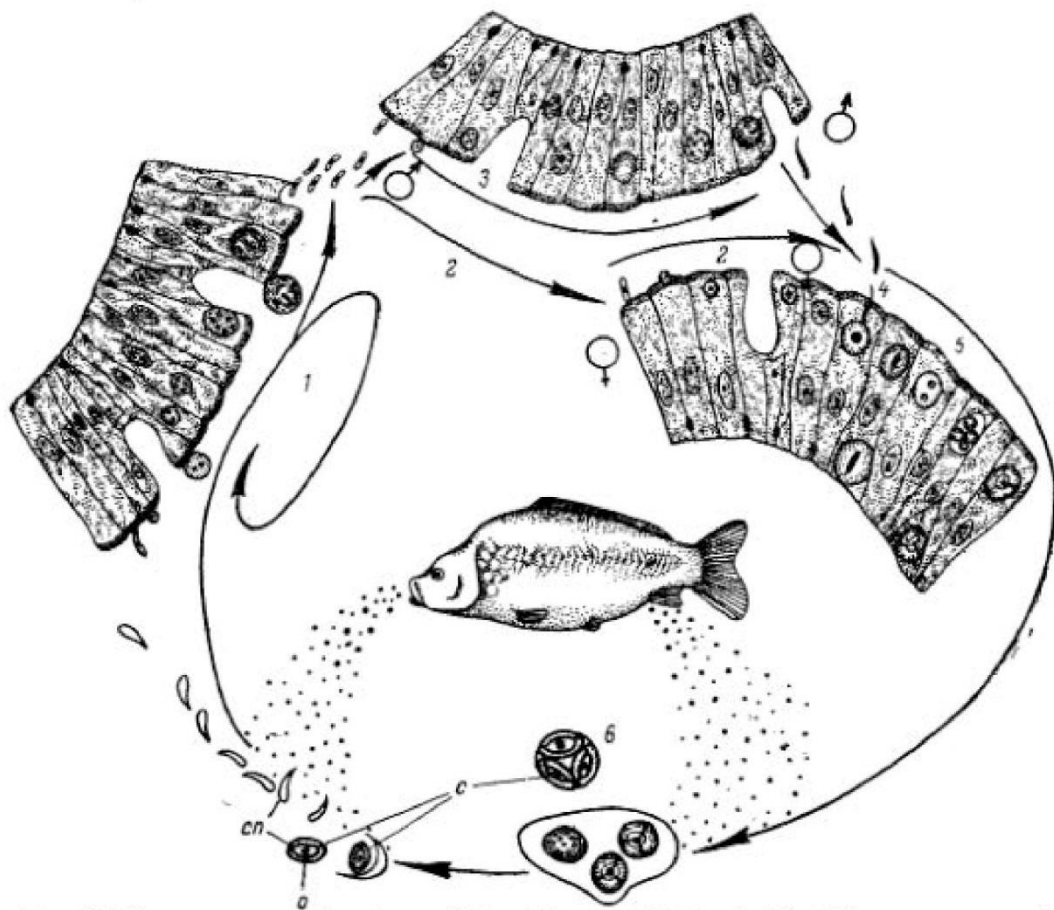


Рисунок 28 – Цикл развития кокцидий

1 – шизогония, 2 – образование макрогаметы, 3 – образование микрогаметоцитов и микрогамет, 4 – оплодотворение, 5 – образование ооцисты и спороцист, 6 – ооциста (с – спороцисты, о – остаточное тело, сп - спорозоиеты)

Больные рыбы плохо поедают корм, не реагируют на внешние раздражители, у них отмечается ерошение чешуи, брюшко рыбы вздуто, из анального отверстия выделяются желтоватые тяжи, иногда с кровавыми сгустками. У рыб отмечают катаральное воспаление кишечника, точечные кровоизлияния, скопление слизи. Помимо механического, паразит оказывает и токсическое воздействие на организм рыбы. Кокцидиозный энтерит толстолобика вызывают *Goussia cheni* (пестрый толстолобик), *G. sinesis* (белый толстолобик).

Кокцидиоз семенников сельдевых вызывается *Eimeria sardinae*. Паразит связан с половым циклом хозяина, поражает только самцов. Повреждает эпителий семявыносящих канальцев и деформирует семенники. Иногда вызывает полную стерильность хозяина.

2. Сбор материала.

Живую рыбу обездвиживают и кладут в кювету. Вскрывают и выделяют кишечник, просматривают под микроскопом слизистую и стенки кишечника на наличие шизонтов, мерозоитов и зигот. При подозрении на узелковый кокцидиоз внимательно рассматривают слизистую оболочку кишечника, готовят временные препараты и просматривают под микроскопом на наличие узелков (цист), содержащих споры кокцидий.

При исследовании кокцидиоза семенников сельдевых ткань семенников продавливается и просматривается под микроскопом на наличие паразитов. Проводят изучение и зарисовку кокцидий по временным препаратам нативного материала.

3. **Определение паразитов.** Изготовленные или готовые препараты помещают под микроскоп. Рассматривают и зарисовывают расположение спор в ооцисте, остаточного тела, а также спорозоитов в спорах. С помощью определителя выясняют

видовую принадлежность кокцидий. Результаты работы оформляют в тетради для лабораторных занятий.

Ход работы.

5. Ознакомиться с морфологическими признаками кокцидий, являющимися определительными ключами.
6. Записать в тетрадь систематическое положение кокцидий.
7. Изготовить временные препараты, выделенные из представленных на анализ рыб.
8. У найденных паразитов рассмотреть строение ооцисты, расположение в них спор и спорозоитов.
9. Пользуясь определителем паразитов рыб, выяснить видовую принадлежность кокцидий.
10. Результаты работы оформить в тетради для лабораторных занятий.

Контрольные вопросы:

1. Расскажите о строении кокцидий.
2. Как происходит цикл развития кокцидий?
3. Каковы особенности локализации кокцидий в хозяине?
4. Какая стадия развития кокцидий наиболее опасна для рыб?
5. Какие заболевания рыб вызываются кокцидиями?

3. Методические рекомендации по выполнению лабораторных занятий

3.1 Методические рекомендации по подготовке к семинарским занятиям

Семинар – форма обучения, направленная на:

- углубление и закрепление знаний, полученных на лекциях и в ходе самостоятельной работы;

– проверку эффективности и результативности самостоятельной работы студентов над учебным материалом в студенческой аудитории;

– выработку умения формулировать, обосновывать и излагать собственное суждение по обсуждаемому вопросу, умение отстаивать свои взгляды.

Для обучающихся главная задача состоит в том, чтобы усвоить содержание учебного материала темы, которая выносится на обсуждение, подготовиться к выступлению и дискуссии (**см. «Методические указания по выполнению самостоятельной работы по дисциплине»**).

В процессе подготовки к семинарским занятиям необходимо обратить особое внимание на самостоятельное изучение рекомендованной учебно-методической и научной литературы. Самостоятельная работа с учебниками, учебными пособиями, научной, справочной и популярной литературой, материалами периодических изданий и Интернета, статистическими данными является наиболее эффективным методом получения знаний, позволяет значительно активизировать процесс овладения информацией,

способствует более глубокому усвоению изучаемого материала, формирует свое отношение к конкретной проблеме.

Более глубокому раскрытию вопросов способствует знакомство с дополнительной литературой, рекомендованной преподавателем по каждой теме семинарского или лабораторного занятия, что позволяет проявить свою индивидуальность в рамках выступления на данных занятиях, выявить широкий спектр мнений по изучаемой проблеме.

Форма контроля – опрос.

Шкала оценки устного ответа (опрос)

Уровень /оценка	Описание
Продвинутый/ («отлично»)	правильно, всесторонне в полном объеме излагает знания: дает определения, раскрывает содержание понятий, верно использует терминологию; демонстрирует <i>всестороннее и полное</i> понимание смысла изученного материала
Углубленный уровень/ («хорошо»)	правильно, в полном объеме излагает знания: дает определения, раскрывает содержание понятий, верно использует терминологию; демонстрирует понимание смысла изученного материала; <i>допускает малозначительные ошибки</i>
Базовый Уровень/ («удовлетворительно»)	правильно излагает <i>базовые</i> знания: дает определения, раскрывает содержание понятий, верно использует терминологию; демонстрирует понимание <i>основного</i> смысла изученного материала
Нулевой Уровень/ («неудовлетворительно»)	содержание знаниевого компонента <i>не раскрыто</i> ; допускает <i>значительные ошибки</i> в изложении теоретического основ, организации и методологии профессиональной деятельности; <i>не дает ответы на вопросы, в том числе вспомогательные</i>

3.2 Методические рекомендации по решению разноуровневых задач и заданий

При подготовке к решению разноуровневых задач и заданий необходимо повторить соответствующие разделы учебника, учебных пособий по данной теме и конспектов лекций.

Порядок выполнения задания:

- изучить учебную информацию по теме;
- провести системно - структурированный анализ содержания темы;
- изучить обстоятельную характеристику условий задачи или контрольного вопроса;

- предложить вариант (или варианты) решения задачи и ответы на поставленные вопросы.

Форма контроля – правильность решенных задач и заданий.

Шкала оценки решения разноуровневых задач и заданий

Уровень /оценка	Описание
Продвинутый уровень («отлично»)	полное, правильное и обоснованное решение практической задачи, студент продемонстрировал умения и навыки в процессе решения практических задач
Углубленный уровень («хорошо»)	решение в целом правильное и обоснованное, но допущены незначительные ошибки либо решение является неполным.
Базовый уровень («удовлетворительно»)	решение содержит обоснование, ход рассуждений в целом верный, но при этом допущены существенные ошибки в решении практической задачи.
Нулевой уровень («неудовлетворительно»)	отсутствует решение задачи, либо отсутствует обоснование решения, либо решение содержит обоснование, но допущены грубые ошибки, студент продемонстрировал отсутствие умений и навыков в процессе решения практических задач.

3.3 Методические рекомендации по подготовке к контрольной работе

Контрольные работы являются одним из обязательных видов работы студентов.

Целью контрольных работ является выработка у студента навыков самостоятельной работы; формирование навыков работы со специальной литературой и умения применять свои знания к конкретным ситуациям.

Контрольная работа может состоять из теоретической части и (или) заданий (задач) по тем или иным вопросам (темам, разделам) изучаемой дисциплины.

Студенты самостоятельно решают задания контрольных работ. Ответы должны быть аргументированными, обоснованными, полными, сопровождаться необходимыми расчетами и ссылками на источники литературы.

Форма контроля – правильность решенных задач и ответов на поставленные вопросы.

Шкала оценки выполнения контрольной работы

Уровень /оценка	Описание
Продвинутый/ («отлично»)	Демонстрирует полное понимание поставленных вопросов. Представленный ответ по вопросам

	контрольной работы отличается оригинальностью и логичностью изложения
Углубленный уровень/ («хорошо»)	Демонстрирует значительное понимание сути поставленных вопросов. Поставленные контрольные вопросы раскрыты в достаточном объеме, но присутствуют несущественные неточности
Базовый Уровень/ («удовлетворительно»)	Демонстрирует частичное понимание сути поставленных вопросов. Поставленные контрольные вопросы в целом раскрыты, но присутствуют значительные неточности в формулировке требуемых определений
Нулевой Уровень/ («неудовлетворительно»)	Ответы на поставленные вопросы не получены

4. Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины (модуля) представлено в рабочей программе дисциплины